

**Az enzimreakciók nemarrheniusi viselkedésének térszerkezeti háttere –
a konformációs flexibilitás szerepe a fehérjék hőmérsékleti adaptációjában**

Doktori (Ph.D.) értekezés

Hajdú István

Témavezető:

Dr. Závodszy Péter

egyetemi tanár, az MTA rendes tagja

Eötvös Loránd Tudományegyetem Doktori Iskolája

Szerkezeti Biokémia Doktori Program

Programvezető: Dr. Gráf László

Doktori Iskola vezetője: Dr. Erdei Anna

Készült:

A Magyar Tudományos Akadémia

Szegedi Biológiai Központjának Enzimológiai Intézetében

Budapest

2009



Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek és egyben az intézet igazgatójának, Dr. Závodszky Péter akadémikusnak, aki munkámat irányította és támogatta.

Köszönöm Dr. Szilágyi Andrásnak a doktori munkám közvetlen elméleti irányítását, továbbá értékes tanácsait, és nagyon kritikus észrevételeit, amelyek nélkül e dolgozat nem jött volna létre.

Köszönöm Dr. Kardos Józsefnek a kísérleti munka megtervezésénél nyújtott elengedhetetlenül fontos iránymutatását.

Köszönet Kazinczyné Dr. Vas Máriának, Dr. Németh Attilának, Barna Lászlónak, Végh Barbarának, Gráczér Évának és Csala Zoltánnak, akik munkájukkal, illetve tanácsaikkal nagyban hozzájárultak e dolgozat létrejöttéhez.

Köszönet illeti a csoport és az Enzimológiai Intézet minden munkatársát, akik segítségemre voltak az elmúlt évek során.

Köszönet a TargetEx Kft. és Pharmatest Kft. minden munkatársának, akik segítségével sikerült új kihívásokat találni.

Köszönetet szeretnék továbbá mondani Dr. Friedrich Péternek, az Enzimológiai Intézet korábbi igazgatójának, és Dr. Erdei Annának, a Biológiai Doktori Iskola vezetőjének illetve Dr. Gráf Lászlónak, a Szerkezeti Biokémia Doktori Program vezetőjének.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni szüleimnek és barátnőmnek, hogy elviselték a hosszúra nyúlt doktori éveket ...és engem.

Tartalomjegyzék

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	3
TARTALOMJEGYZÉK	5
ÁBRAJEGYZÉK	7
TÁBLÁZATJEGYZÉK	9
RÖVIDÍTÉSEK ÉS FIZIKAI MENNYISÉGEK	10
BEVEZETÉS	11
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	13
ADAPTÁCIÓ A KÖRNYEZETI FELTÉTELEKHEZ	13
<i>A magas hőmérséklethez való alkalmazkodás a fehérjék stabilizációja révén.....</i>	<i>13</i>
<i>Az alacsony hőmérséklethez történő alkalmazkodás szerkezeti alapjai.....</i>	<i>16</i>
<i>A hidegkedvelő organizmusok enzimeinek aktivitása.....</i>	<i>18</i>
A STABILITÁS-AKTIVITÁS-FLEXIBILITÁS ÖSSZEFÜGGÉSEI.....	19
<i>A konformációs flexibilitás vizsgálatára alkalmas kísérleti módszerek.....</i>	<i>19</i>
AZ ENZIMEK AKTIVITÁSÁNAK HŐMÉRSÉKLETFÜGGÉSE.....	21
IRÁNYÍTOTT ÉS RANDOM MUTAGENEZIS FELHASZNÁLÁSA ENZIMEK TERVEZÉSÉBEN	22
<i>A konformációs flexibilitás módosítása mutagenézis útján.....</i>	<i>23</i>
MODELLENZIMEK.....	24
<i>GAPDH.....</i>	<i>24</i>
<i>IPMDH</i>	<i>26</i>
CÉLKITŰZÉS.....	30
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	31
DNS MUNKA	31
IRÁNYÍTOTT MUTAGENEZIS	32
FEHÉRJEEXPRESSZIÓ	32
FELDOLGOZÁSI MŰVELETEK.....	34
<i>Eredeti konstrukciók és mutáns IPMDH változatok</i>	<i>34</i>
<i>Új konstrukciók</i>	<i>34</i>
ENZIMAKTIVITÁS MÉRÉSE	35
<i>IPMDH</i>	<i>35</i>
<i>GAPDH.....</i>	<i>35</i>
CD SPEKTROSKÓPIA	36
DSC	36
FT-IR MÉRÉSEK	37
<i>H/D kicserélődés.....</i>	<i>37</i>
FLUORESCENCIA.....	39

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS.....	40
A GAPDH NEMARRHENIUSI VISELKEDÉSE	40
A GAPDH enzimaktivitásának hőmérsékletfüggése	40
A GAPDH konformációs változásai	41
A GAPDH konformációs flexibilitása	41
B-faktor analízis	45
KÜLÖNBÖZŐ HŐMÉRSÉKLETEKHEZ ADAPTÁLÓDOTT IPMDH ENZIMEK FUNKCIONÁLIS ÉS SZERKEZETI	
STABILITÁSÁNAK HŐMÉRSÉKLETFÜGGÉSÉNEK VIZSGÁLATA	47
Az enzimaktivitás hőmérsékletfüggése.....	47
A fehérjekonformáció hőmérsékletfüggő változásai.....	51
A konformációs flexibilitás hőmérsékletfüggése	51
Szubsztrátindukált szerkezeti változások jellemzése (CD, DSC, H/D)	55
AZ E. COLI IPMDH KINETIKAI TULAJDONSÁGAINAK RENDHAGYÓ HŐMÉRSÉKLETFÜGGÉSE	59
Az enzimaktivitás hőmérsékletfüggése.....	59
A fehérjekonformáció hőmérsékletfüggő változásai.....	62
A szubsztrát-enzim affinitás hőmérsékletfüggő változása	65
FRET mérések a hőmérséklet függvényében és azok szerkezeti, illetve dinamikai értelmezése	67
Az E. coli IPMDH enzim működésének dinamikus modellje	69
Az E. coli IPMDH enzim működési mechanizmusa	70
IRÁNYÍTOTT FLEXIBILITÁSNÖVELŐ MUTÁCIÓK HATÁSA A T1PMDH SZERKEZETÉRE ÉS AKTIVÁSÁRA.....	72
Tervezés összerendezés segítségével	72
A mutáns enzimek konformációs flexibilitásának jellemzése.....	75
A mutáns enzimek hőstabilitása	76
A mutáns enzimek aktivitása	78
Következtetések a flexibilitásnövelő mutációkról.....	78
ÖSSZEFOGLALÁS	81
AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK	84
IRODALOMJEGYZÉK	85
ÖSSZEFOGLALÓ	94
SUMMARY	95

Ábrajegyzék

1. ábra: A fehérjék lehetséges hőstabilizációs stratégiái	14
2. ábra: A hideghez alkalmazkodott fehérjék stabilizációs görbéje.....	17
3. ábra: A termofil és hidegkedvelő enzimek felgombolyodásának tölcsermodellje.....	17
4. ábra: A GAPDH tetramer szerkezete	25
5. ábra: Az IPMDH dimer molekula szerkezete	27
6. ábra: A különböző IPMDH szerkezetek összerendezése.....	29
7. ábra: A gliceraldehid-3-foszfát oxidációjának sebességi állandójának hőmérsékletfüggése.....	40
8. ábra: Egy jellegzetes H/D kicserélődési kísérlet nyúlizom GAPDH esetében.....	42
9. ábra: TmGAPDH és RmGAPDH H/D kicserélődésének vizsgálata relaxációs spektrum formájában ábrázolva szobahőmérsékleten	43
10. ábra: TmGAPDH és RmGAPDH H/D kicserélődésének relaxációs görbe formájában történő ábrázolása az optimális működési hőmérsékletükön	44
11. ábra: A nyúlizom GAPDH tetramer szerkezete	46
12. ábra: A négy különböző környezetben élő organizmusból származó IPMDH sebességi állandójának hőmérsékletfüggése	47
13. ábra: A három IPMDH által katalizált reakcióban a NAD Michaelis-Menten állandójának hőmérsékletfüggése	49
14. ábra: A három IPMDH által katalizált reakcióban az IPM Michaelis-Menten állandójának hőmérsékletfüggése	50
15. ábra: A három IPMDH által katalizált reakció specificitási konstansának hőmérsékletfüggése ($k_{cat}/K_{M,IPM}$).....	50
16. ábra: A három IPMDH által katalizált reakció specificitási konstansának hőmérsékletfüggése ($k_{cat}/K_{M,NAD}$).....	51
17. ábra: A <i>Thermus thermophilus</i> IPMDH különböző hőmérsékleteken mért H/D kicserélődési profilja relaxációs spektrum formájában ábrázolva.....	52
18. ábra: A <i>Vibrio</i> sp. 15 IPMDH különböző hőmérsékleteken mért H/D kicserélődési profilja relaxációs spektrum formájában ábrázolva.....	53
19. ábra: Az <i>E. coli</i> IPMDH különböző hőmérsékleteken mért H/D kicserélődési profilja relaxációs spektrum formájában ábrázolva.....	53
20. ábra: A három IPMDH enzim konformációs flexibilitásának hőmérsékletfüggése	54
21. ábra: <i>E. coli</i> IPMDH különböző ligandumállapotú komplexeinek H/D kicserélődéses vizsgálatának eredményei relaxációs spektrum formájában 30°C-on.....	57
22. ábra: <i>Thermus thermophilus</i> IPMDH különböző ligandumállapotú komplexeinek H/D kicserélődéses vizsgálatának eredményei relaxációs spektrum formájában 55°C-on.....	58
23. ábra: Az <i>E. coli</i> IPMDH által katalizált reakció hőmérsékletfüggése.....	59
24. ábra: Az <i>E. coli</i> IPMDH által katalizált reakcióban a NAD Michaelis-Menten állandójának hőmérsékletfüggése	60
25. ábra: Az <i>E. coli</i> IPMDH által katalizált reakcióban az IPM Michaelis-Menten állandójának hőmérsékletfüggése.....	60

26. ábra: Az <i>E. coli</i> IPMDH által katalizált reakció specificitási konstansának hőmérsékletfüggése ($k_{cat}/K_{M,NAD}$).	61
27. ábra: Az <i>E. coli</i> IPMDH által katalizált reakció specificitási konstansának hőmérsékletfüggése ($k_{cat}/K_{M,IPM}$).	61
28. ábra: <i>E. coli</i> IPMDH valódi és hipotetikus (szaggatott vonal) kalorimetriás görbéje, IPM hiányában	63
29. ábra: <i>E. coli</i> IPMDH valódi és hipotetikus (szaggatott vonal) kalorimetriás görbéje, IPM jelenlétében	63
30. ábra: Az <i>E. coli</i> IPMDH távoli UV tartományban felvett CD spektruma különböző hőmérsékleteken	64
31. ábra: Az <i>E. coli</i> IPMDH közeli UV tartományban felvett CD spektruma különböző hőmérsékleteken	65
32. ábra: Az <i>E. coli</i> IPMDH fluoreszcenciaspektruma IPM jelenlétében és hiányában állandó koncentrációjú NADH mellett	66
33. ábra: Az <i>E. coli</i> IPMDH aktivitásméréséből meghatározott Michaelis-Menten állandó és a FRET mérésekből meghatározott disszociációs állandó hőmérsékletfüggése	66
34. ábra: Az <i>E. coli</i> IPMDH enzim szerkezetének sematikus ábrázolása	68
35. ábra: Az <i>E. coli</i> IPMDH f' paraméterének hőmérsékletfüggése	69
36. ábra: A <i>Thermus thermophilus</i> IPMDH térszerkezete	73
37. ábra: Az IPMDH szekvenciák összerendezésének részlete	74
38. ábra: A P-G mutációk hatása a TtIPMDH konformációs flexibilitására a mutációk számának függvényében	75
39. ábra: A TtIPMDH mutánsainak konformációs flexibilitásának hőmérsékletfüggése	76
40. ábra: A TtIPMDH mutánsainak konformációs flexibilitása a mutációk számának függvényében	76
41. ábra: A TtIPMDH többszörös glicin-prolin mutánsainak hőstabilitása a mutációk számának függvényében	77
42. ábra: A TtIPMDH mutánsok hőstabilitásának és konformációs flexibilitásának összehasonlítása	79
43. ábra: A mutáns TtIPMDH enzimek relatív aktivitása a flexibilitásuk függvényében	79

Táblázatjegyzék

1. táblázat: A globuláris fehérjéken belül megfigyelhető legfontosabb mozgások típusai, azok fizikai jellemzői.	20
2. táblázat: Különböző organizmusokból származó IPMDH-k nemarrheniusi katalízisének jellegzetes hőmérsékletei.....	48
3. táblázat: A vizsgált három organizmus és IPMDH enzimeik jellemző hőmérsékleti adatai.....	55
4. táblázat: A különböző ligandumállapotú IPMDH komplexek kalorimetriával meghatározott olvadási hőmérséklete.....	55
5. táblázat: Az elkészített, később kóddal említett mutációk jelölései.....	73
6. táblázat: Mutációk hatása a TiIPMDH hőstabilitására.	77
7. táblázat: A flexibilitásukban módosított mutáns TiIPMDH enzimek relatív aktivitása	78

Rövidítések és fizikai mennyiségek

ΔG	szabadentalpia különbség
ΔH	entalpia különbség
ΔS	entrópia különbség
ΔC_p	hőkapacitás különbség
k_{cat}	összetett enzimkinetikai sebességi állandó
K_M	Michaelis-Menten állandó
K_d	disszociációs állandó
T_m	olvadási hőmérséklet
<i>Ec, E. coli:</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Rm</i>	nyúlizom (<i>rabbit muscle</i>)
<i>Tt, T. thermophilus:</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
<i>Tm, T. maritima:</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
<i>Vi</i>	<i>Vibrio sp. I5</i>
<i>St, S. tokodaii</i>	<i>Sulfolobus tokodaii</i>
CD:	cirkuláris dikroizmus
DEAE	dietilaminoetil
DSC:	differential scanning calorimetry
FRET	Förster (fluoreszcencia) rezonancia elektron transzfer
FT-IR,	Fourier-transzformációs-infravörös
GAPDH:	gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz
GuHCl	guanidin-hidroklorid
H/D kicserélődés:	hidrogén-deutérium izotópkicserélődés
IPM	3-isopropyl-malate (izopropil-almasav)
IPMDH:	3-izopropil-malát dehidrogenáz
IPTG:	izopropil- β -tiogalaktozid
NAD	Nikotin-Adenin Dinukleotid oxidált forma
NADH	Nikotin-Adenin Dinukleotid redukált forma
NMR:	mágneses magrezonancia
NTA	nitril-triecentsav
PDB	Protein Data Bank

Bevezetés

A fehérjék – különösen az enzimek – különös és érdekes megjelenési formáját képviselik az anyagnak. Nagyfokú specificitásukat egyedi térszerkezetük és felszíni mintázatuk, hatékony – katalitikus és egyéb – funkciójukat szerkezetük rugalmassága, konformációs flexibilitásuk biztosítja. Ezen a fehérjékre és csakis a fehérjékre jellemző tulajdonságok mögött az élettelen világban is működő erők és fizikai kölcsönhatások vannak.

A fehérjemolekulák egyik sajátossága, hogy szerkezeti stabilitásukat és működőképességüket csak megfelelő környezeti tényezők mellett és meglehetősen szűk hőmérsékleti tartományban őrzik meg.

Laboratóriumunkban fehérjék működésének szerkezeti hátterével foglalkozunk. Ennek során a környezeti tényezők hatását vizsgálva az enzimek működésére, számos érdekes megfigyelést tettünk. Tekintettel arra, hogy az egyes fehérjék konformációs stabilitása csak élettani hőmérsékletük szűk környezetében biztosított, hidegtűrő, mezofil és hőkedvelő mikroorganizmusokból izolált (ortológ) enzim sorokon vizsgáltuk a katalitikus funkciók és a szerkezeti stabilitás, valamint a konformációs flexibilitás összefüggéseit, kiszélesítve ezáltal a vizsgálható hőmérséklettartományt.

Arra a kérdésre kerestük a választ: miként valósul meg az enzimek szintjén a környezeti hőmérséklethez való alkalmazkodás. Miként tükröződik a katalitikus aktivitás megváltozott hőmérsékleti optimuma a fehérje konformációs stabilitásában és szerkezeti flexibilitásában. Arra a kérdésre is választ kerestünk, hogy milyen fizikai kölcsönhatások biztosítják a fehérjéknek a környezeti feltételekhez – elsősorban a környezeti hőmérséklethez történő alkalmazkodását az atomi kölcsönhatások és mozgások szintjén.

A kémiai reakciók hőmérsékletfüggését az Arrhenius-egyenlet írja le, amely szerint a reakciósebességi állandó a hőmérséklet függvényében exponenciálisan növekszik. Az enzimek által katalizált reakciók esetén a sebességi állandót az enzim konformációja és dinamikai sajátosságai módosítják, így a sebességi állandó hőmérsékletfüggésében ezeknek a fizikai tulajdonságoknak a hőmérsékletfüggése is tükröződik, ennek eredményeként az enzimkinetikai paraméterek hőmérsékletfüggése nem mindig követi a nemkatalizált kémiai reakciók esetén megfigyelhető lineáris összefüggéseket. A nemarrheniusi viselkedés vizsgálata során felvetődött az enzimreakciók csatolása a konformációs fluktuációkkal, és feltételezések szerint ezek hőmérsékletfüggése befolyásolhatja a katalizált reakciók összetett sebességi állandóinak viselkedését.

Doktori munkámban a konformációs flexibilitás és az enzimaktivitás közötti összefüggéseket kerestem, az összefüggéseket a kísérletsorozatok előrehaladásával fokozatosan egyre nagyobb alapossággal vizsgálva. A kísérleteket különböző hőmérséklettartományhoz adaptálódott organizmusok enzimeivel végeztem, amely módszer lehetőséget adott a hőmérséklettartomány kiszélesítésére, noha az egyes enzimek működési hőmérsékletintervalluma szűk.

Irodalmi áttekintés

Adaptáció a környezeti feltételekhez

Az organizmusoknak, illetve az őket felépítő alapelemeknek egyaránt alkalmazkodni kell a környezet által megszabott feltételeknek. Az élet szempontjából fontos, hogy az organizmus környezete által megkövetelt viszonyok között jól működjön az enzim. A környezeti viszonyokat a következő paraméterek határozzák meg: a hőmérséklet, a pH és az ionerősség, valamint a nyomás. A természetben a szélsőséges körülmények között is megtalálhatóak élőlények, az ún. extremofilek. Ezek között vannak termofilek, pszichofilek, acidofilek, alkalofilek, halofilek és barofilek is. Az alkalmazkodásban szerepet játszanak protektív kismolekulák (1) és fehérjék, valamint a membránok összetétele (2), de a magas hőmérséklet eltűréséhez nem elegendő ezeknek a kompenzáló mechanizmusoknak a felhasználása, a fehérjéknek önmagukban is hőstabilnak kell lennie (3). A szerkezeti stabilitás feltárására irányuló kísérleteknek elsődrendű célpontjai a magas hőmérsékleten stabil és aktív fehérjék (4-9).

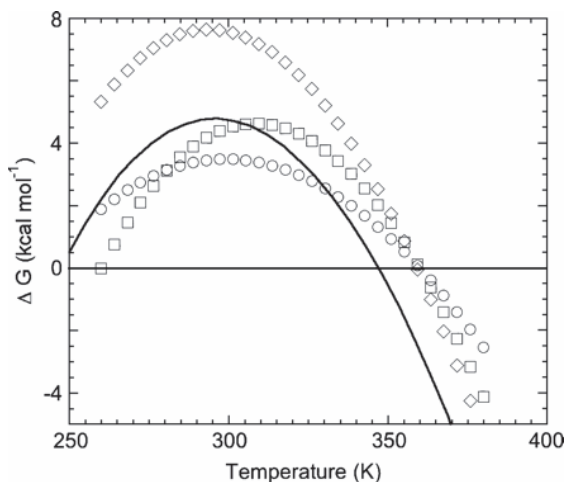
A magas hőmérsékletre való alkalmazkodás a fehérjék stabilizációja révén

A fehérjék stabilitását fizikai kölcsönhatások összessége határozza meg, a legfőbb stabilizációs kölcsönhatások a hidrofób kölcsönhatás és a hidrogénkötés, míg a konformációs entrópia a destabilizációt mozditja elő. A funkcionális állapot (natív állapot) marginálisan stabilabb a denaturált állapotoknál, a két állapot közti szabadentalpia-különbség általában 20-40 kJ/mol (10), ez mindössze néhány hidrogén-kötés energiájának felel meg. A fehérjék stabilitását a natív állapot hőmérséklet vagy denaturálószer által előidézett perturbációjának segítségével lehet kísérletileg vizsgálni (11, 12). A mérések eredményét a fehérjék stabilitásgörbéjével lehet szemléltetni, ahol a stabilizációs szabadenergiát (ΔG) a hőmérséklet függvényében ábrázolják (13). A görbét a Gibbs-Helmholtz egyenlet módosított változata írja le (1):

$$\Delta G(T) = \Delta H_m \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) - \Delta C_p \times \left[(T_m - T) + T \ln\left(\frac{T}{T_m}\right)\right] \quad (1),$$

ahol $\Delta G(T)$ a szabadenergia T hőmérsékleten, ΔH_m az entalpiaváltozás T_m hőmérsékleten, ΔC_p a fehérje legombolyodásával kapcsolatos változás a hőkapacitásban, és T_m a fehérje natív

és denaturált állapotának átmenetéhez tartozó átmeneti hőmérséklet, egyszerűbben olvadáspont. A fehérjestabilitási görbe segítségével a konformációs stabilitás minden hőmérsékleten értelmezhető. A görbe egy maximummal rendelkező, parabolára hasonlító görbe, ahol a maximumhoz tartozó ΔG érték a maximális konformációs stabilitás, míg a $\Delta G=0$ értékhez tartozó két hőmérséklet a hideg- és hődenaturációs hőmérséklet. Ennek a görbének a vizsgálata különböző hőstabil enzimeknél három adaptációs stratégiára derített fényt (14). Az első stratégia a teljes görbének magasabb ΔG értékre való emelését jelenti, a második lehetőség a görbe kiszélesedése, míg a harmadik a görbe eltolódása magasabb hőmérsékletek irányába (1. ábra):



1. ábra: A fehérjék lehetséges hőstabilizációs stratégiái (9)

A termodinamikai magyarázat az első esetben a ΔH növelése a ΔS kompenzáló változása nélkül, a második esetben az alacsonyabb ΔC_p , míg a harmadik esetben pedig a ΔS csökkenése okozza a változást a görbe alakjában. A valóságban is megfigyelhetők ezek a stratégiák, akár önmagukban, akár kombinációk formájában. A kísérleti módszer homológ mezofil-termofil enzimpárok stabilitásának összehasonlítása, aminek értelmezését segíti a Protherm adatbázis is (15), amely az enzimek összegyűjtött termodinamikai paramétereit tartalmazza. A stratégiák összehasonlítása alapján (9, 16) az első és második stratégia a leginkább elterjedt a természetben (77, ill. 70% a vizsgálati mintában), míg a harmadik stratégia kevésbé elterjedt (31%).

A hőstabilitás termodinamikai megközelítése mellett a szerkezeti vizsgálatok is nagy számú adalékot nyújtottak az adaptáció megértéséhez. Ezek a munkák mezofil-termofil (hipertermofil) ortológ enzimek összehasonlító szerkezeti vizsgálataira alapulnak, amelyeknek alapvető feltétele az enzimek jó felbontású 3D szerkezeteinek ismerete, ami az elmúlt években egyre nagyobb számban rendelkezésre áll a fehérjeadatbankban (Protein DataBase, PDB). A szerkezetek szerint a termofil fehérjék különböző szerkezeti stratégiákat alkalmaznak a magas hőmérsékleten történő működésre és stabilitásra. Alapvető megfigyelés volt, hogy a különböző fehérjecsaládok különböző alkalmazkodási stratégiát használnak. Ez a tény felhívta a figyelmet arra, hogy a mezofil, termofil és hipertermofil fehérjék módszeres összehasonlításához számos fehérjecsaládot párhuzamosan analizálva lehet csak megfelelően alátámasztható eredményhez jutni a hőstabilitás szekvenciális és szerkezeti vizsgálatai során. A statisztikából kapott eredmények hasznosak lehetnek hőstabil fehérjék racionális tervezésénél és irányított evolúciós kísérletek értelmezésében (17). Az egyedi vizsgálatok számos szerkezeti tényezőnek a hőstabilitásban játszott szerepét mutatta meg: nagyobb hidrofobicitás, hurokrégiók rövidülése vagy deléciója (18), kisebb illetve kevesebb üreg, nagyobb eltemetett felszín az oligomerizáció során (19, 20), aminosavak mutációja a másodlagos szerkezeti elemekben (21), a hurkokban előforduló prolinok nagyobb aránya (22, 23), termolabilis aminosavak kisebb aránya (24), hélixek nagyobb mennyisége, megnövelt poláris felszín, jobb hidrogénkötéshálózat, jobb sóhidak kialakulása (25, 26). Az összehasonlító vizsgálatok során az egyes tényezők egymáshoz viszonyított jelentőségét jobban lehetett vizsgálni. Az egyik összehasonlítás szerint (27) az elágazó láncú aminosavak száma korrelál jól a hőstabilitással. Más tanulmányok az elektrosztatikus kölcsönhatások (sóhidak és hidrogénkötések) dominanciáját hangsúlyozzák (6, 28). Munkacsoportunkban is készült egy igen alapos vizsgálat a témakörben (29): 64 mezofil és 29 termofil fehérje (amely 25 fehérjecsaládot képvisel) 13 szerkezeti tulajdonságot figyelembe vevő kutatása során kiderült, hogy a mérsékelt termofil és hipertermofil fehérjék adaptációja eltérő, és a legfontosabb stabilizációs hatása az ionpárok kialakulásának van.

A genomika korában újabb lehetőségek nyíltak a hőstabilitást meghatározó szekvenciális elemek azonosítására. Jelenleg 4707 teljes genom szekvenciája ismert (NCBI/Genome adatbázis), ebből jelentős számú termofil élőlényhez tartozik. Teljes genomok összehasonlítása alapján a termofil fehérjék rövidebbek mezofil ortológjaiknál, a töltött aminosavak (Arg, Lys, His, Asp, Glu) magasabb, valamint a semleges, poláris aminosavak (Ser, Thr, Gln, Asn, Cys) alacsonyabb száma szignifikáns (30-32).

Egyértelmű választ nem tudunk adni arra a kérdésre, hogy mely szerkezeti tényezők játszanak

szerepet a hőstabilitás kialakulásában; valószínű, hogy nincs olyan szerkezeti elem, amely kiemelhető lenne, mint egyedüli meghatározó tényező. Különböző fehérjék, más-más stratégiát követve, változatos módon képesek adaptálódni a különböző környezeti viszonyokhoz, de vannak olyan stabilizációs faktorok, amelyeket előszeretettel alkalmaz a természet (6).

Az alacsony hőmérséklethez történő alkalmazkodás szerkezeti alapjai

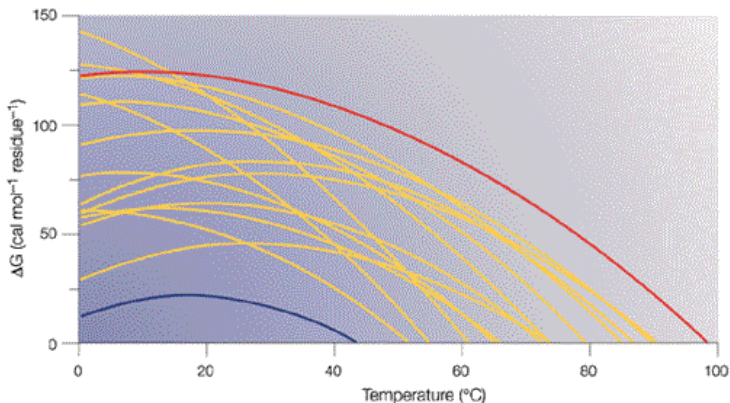
A földi bioszféra 75%-a a hideg területek közé tartozik. A hidegkedvelő organizmusok állandóan hideg (akár 5°C-nál is hidegebb állandó hőmérséklet) környezetben is megtalálhatóak szárazon, csakúgy, mint hideg óceánokban. A hidegben élő organizmusokat hidegkedvelőként és hidegtűrőként kategorizálják rendszerint, az előbbieket pszichrofilek vagy sztenopszichrofilek, az utóbbiak pszichrotrofok vagy eurypszichrofilek (33, 34). Én szívesebben használom a magyar elnevezéseket, mivel a nemzetközi elnevezések a termofilekkel ellentétben nem igazán terjedtek el kis hazánkban.

A hideghez való alkalmazkodás teljesen más kihívást jelent, mint a meleghez való alkalmazkodás: itt jóval inkább kinetikai jellegű a feladat, vagyis olyan enzimekkel kell rendelkezni, amelyek alacsony hőmérsékleten is képesek jól működni. Természetesen ugyanúgy lehet számolni a kismolekulák, hidegsokkfehérjék (35, 36), membránok (37), stb. hozzájárulásával a hidegadaptációban is, de elsősorban az enzimek adaptációja a fő meghatározója a hideghez való alkalmazkodásnak.

A magas hőmérséklethez való alkalmazkodásban el lehetett különíteni azokat a szekvenciális és szerkezeti okokat, amelyek miatt a lehetséges 20 aminosavból azonos funkciójú, de hőre kevésbé érzékeny fehérjéket lehet előállítani. Kérdéses, hogy a hidegadaptáció esetén is ugyanúgy megtalálhatóak-e ezek a szerkezeti információk. A válasz – legalábbis részben – pozitív. A rendelkezésre álló szerkezetek alapján a prolinok és argininek száma alacsonyabb, míg a glicin klaszterek nagyobb arányban fordulnak elő (38). A gyenge kölcsönhatások hálózata kevésbé kiterjedt, a hidrofób mag kisebb, a fehérjék kevésbé kompakta. A fehérjék felszínén kevesebb ionpár található, nagyobb az apoláris csoportok felszínre kerülésének valószínűsége, és a negatív töltéseké, ami elősegíti az oldószerrel való kölcsönhatások kialakítását (39, 40). Itt is megfigyelhető az a tendencia, hogy az egyes fehérjecsaládok különböző stratégiákat alkalmaznak az adaptációban (41, 42).

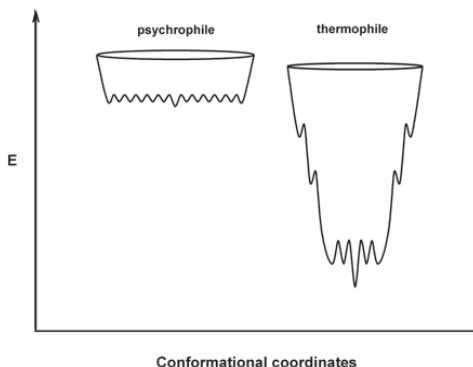
A hidegkedvelő organizmusok fehérjéinek szerkezeti stabilitása nagyon alacsony, jóval kevesebb stabilizáló kölcsönhatás figyelhető meg, mint a mezofil ortológok esetén (43, 44). A

korábban már ismertetett stabilitási görbének az alacsonyabb stabilitás irányába való eltolódása figyelhető meg (2. ábra), ami egyben azt is jelenti, hogy a hidegkedvelők enzimei nemcsak a hővel, de a hideggel szemben is jóval érzékenyebbek akár a mezofil enzimeknél is. A maximális stabilitás ugyanazon a hőmérsékleten figyelhető meg, ami arra utal, hogy a felgombolyodás során itt is a hidrofób kölcsönhatás a fő hajtóerő.



2. ábra: A hideghez alkalmazkodott fehérjék stabilitási görbéje (kék) a mezofil (sárga) és termofil (piros) szerkezetekhez képest mutatja az alacsonyabb szerkezeti és hőstabilitás energetikai körülményeit (33)

A hidegkedvelő és termofil enzimek stabilitása a felgombolyodás tölcsermodellje alapján jól leírható (45-47). A 3. ábra mutatja az enzimek energiatérképét (48).



3. ábra: A termofil és hidegkedvelő enzimek felgombolyodásának tölcsermodellje (48).

A tölcser szája a hidegkedvelők esetén szélesebb, ez összefügg az alacsonyabb prolin- és magasabb glicintartalommal, így a lehetséges konformerek száma is nagyobb. A felgombolyodás során a szabadenergia csökken, párhuzamosan a konformerek számával. A termofilek felgombolyodásában gyakran intermediér állapotok is léteznek, míg a hidegkedvelőkben alig. A tölcser alja, amely a natív állapotú fehérjesokaságot jellemzi, is különbözik, a termofil enzimek esetén egy jól definiált stabil állapot létezik (49), míg a hidegkedvelők esetén több hasonló energiájú állapot is megjelenik.

A hidegkedvelő organizmusok enzimeinek aktivitása

A hidegben élő organizmusok számára nem a stabilitás előbbieken ismertetett szabályozása azonban a kulcskérdés, hanem az enzimaktivitása. Az aktivitás hőmérsékletfüggését az Arrhenius-egyenlet írja le (2):

$$k = \kappa \left(\frac{k_B T}{h} \right) e^{-\Delta G^\ddagger / RT} \quad (2)$$

A hőmérséklettel való exponenciális kapcsolat miatt az aktivitás hőmérsékletfüggése igen jelentős, 0 °C-on a reakciósebesség 20-250-szer alacsonyabb, mint 37 °C-on, az enzimeknek mégis működniük kell. Általában megfigyelhető, hogy a hidegkedvelő enzimek által katalizált reakciók aktiválási szabadentalpiája és entalpiája alacsonyabb, mint mezofil és termofil ortológjaik esetén, így az enzimreakció hőmérsékletfüggése kisebb. Ez tekinthető a hideghez való elsődleges adaptációs stratégiának (50, 51), amit szerkezetileg úgy érnek el, hogy az aktivált állapot eléréséhez kevesebb entalpia-vezérelt kölcsönhatás megszüntetése szükséges. Mivel ezek a kölcsönhatások az aktív helyet érintik leginkább, az enzimeknek ezek a részei még inkább hőérzékenyek. Ezt jól alátámasztják azok a hőinaktivációs kísérletek, melyek szerint a hidegkedvelő enzimek alacsonyabb hőmérsékleten inaktiválódnak, mint ahol hődenaturálódnak (48, 52). Az alacsony entalpiikus hozzájárulás a katalízisben általában magával hordozza a kedvezőtlen entropikus hozzájárulást. Ez azt jelenti, hogy a katalízis során az aktív hely szerkezete nagymértékben deformálódik, így a szubsztrátok a flexibilisebb aktív helyhez rosszabbul kötődnek, és ennek eredményképpen a megfigyelés az, hogy a hidegadaptálódott enzimek k_{cat} értéke megnő, viszont a K_M érték is hasonlóképpen növekszik (53). A szubsztráthoz való affinitás nem minden esetben csökken a hidegkedvelőknél, a telítési koncentráció alatt működő enzimek esetén (intracelluláris enzimek) az affinitás kritikus, itt a k_{cat}/K_M határozza meg a reakciósebességet, ekkor a k_{cat} növekedése mellett a K_M csökkenése is megfigyelhető volt (54-56).

A stabilitás-aktivitás-flexibilitás összefüggései

A hidegkedvelő enzimekre jellemző a nagy flexibilitás, magas specifikus aktivitás alacsony hőmérsékleteken, valamint a kismértékű hőstabilitás (38, 57), míg a hőstabil homológok rigidek és kis aktivitással rendelkeznek szobahőmérsékleten (58). Az ellentétes tulajdonságok alapján feltételezhető, hogy összefüggés van az aktivitás és stabilitás között, amit a flexibilitás közvetít. A katalízis folyamán az enzimek katalitikus régiójának mozgásai segítik elő a szubsztrátok kötődését, illetve átalakítását. Egy enzim funkciójának az optimalizálása adott hőmérsékleten két ellentétes irányú tényező közti egyensúly megtalálásán alapul: egyrészt szükséges a szerkezeti stabilitás, ami az enzim megfelelő 3D szerkezetét biztosítja, másrészt a konformációs flexibilitás, ami lehetővé teszi a katalízist (59, 60). A hőstabilitás megőrzése végett a termofil enzimek szerkezete szobahőmérsékleten nagyon kompakt és rigid, amit leggyakrabban a nagyon szorosan pakolt hidrofób mag és a felszíni ionpárhálózat biztosít (5, 61, 62). A hidrofób kölcsönhatást sokan a fehérjék legfőbb stabilizációs kölcsönhatásaként ismerik el (63, 64), azonban egyes kutatások szerint 87°C fölött már nincs stabilizáló hatása (65), így további fizikai erők, a sóhidak és a hidrogénkötések stabilizáló hatása is esszenciális (66). A stabilitás biztosításának másik módja a natív állapot entrópiájának növelése (67). A hőstabilitás azonban nem minden esetben jelenti azt, hogy a termofil enzim aktivitása alacsonyabb mezofil megfelelőjénél (68, 69). A másik oldalon álló hidegkedvelő enzimek esetén feltételezhető, hogy a megnövekedett flexibilitás tudja kompenzálni az alacsony termikus energiát biztosító környezet által okozott hátrányt. Így kis energiabefektetéssel is képesek lehetnek ezek az enzimek a szubsztrát kötéséhez megfelelő konformációt kialakítani, és magas specifikus aktivitást biztosítani, de ez azzal a hátránnyal járna hogy magasabb hőmérsékleten könnyebben összeomlik szerkezetük. A hidegkedvelő enzimek alacsony stabilitása alátámasztja ezt az elképzelést, de a flexibilitással nehezebb kapcsolatba hozni a megfigyelteket.

A konformációs flexibilitás vizsgálatára alkalmas kísérleti módszerek

A flexibilitás fogalma a makromolekulák - mint a fehérjék – világában nehezen definiálható. A fehérjék dinamikus viselkedését számtalan mozgás határozza meg, amelyeknek kiterjedése, amplitúdója és időskálája jelentősen eltér (1. táblázat).

A különböző időskálájú mozgások detektálására különböző kísérleti megoldások alkalmasak, azonban rendszerint még ezek sem elégségesek a több mozgástípus közti csatolások

jellemzésére. Több bevált technika létezik a szerkezeti flexibilitás vizsgálatára, mint pl. a hidrogén-deutérium kicserélődés, foszforeszcencia, fluoreszcencia kioltás, NMR, neutronszórás, röntgenszórás B-faktorainak elemzése.

A mozgás típusa	Térbeli kiterjedés (angström)	Amplitúdó (angström)	Jellemző időskála
Kötések rezgései	2-5	0,01-0,1	10-100 fs
Globuláris régiók rugalmas deformációi	10-20	0,05-0,5	1-10 ps
Felszíni oldalláncok rotációja	5-10	5-10	10-100 ps
Eltemetett csoportok torziós rezgései	5-10	0,5	10 ps - 1 ns
Globuláris domének relatív mozgásai	10-20	1-5	10 ps - 100 ns
Belső oldalláncok rotációja	5	5	100 μ s - 1 s
Allosztérikus átmenetek	5-40	1-5	10 μ s - 1 s
Lokális legombolyodás	5-10	5-10	10 μ s - 10 s

1. táblázat: A globuláris fehérjéken belül megfigyelhető legfontosabb mozgások típusai, azok fizikai jellemzői

A módszerek egyik része a hidrogén-deutérium kicserélődés követésén alapul. A nehézvízbe helyezett liofilizált fehérje peptidhidrogénjei deutériumra tudnak cserélődni (70, 71), s ezt akár infravörös spektroszkópiával, akár tömegspektrometriával vagy NMR-rel lehet követni. A módszereket ezen a helyen nem részletezve megállapítható, hogy az infravörös követési módszerrel a fehérje összes peptidhidrogénje egyszerre követhető (72, 73), a fehérje globális flexibilitásáról nyújtva információt. A tömegspektrometriával követett H/D kicserélődés során a proteolitikus fragmentálás segítségével már nagyobb felbontást lehet elérni, de itt is még 10-20 aminosavnyi részlet a minimális méret (74, 75). Ezeknek a technikáknak komoly hátránya a másodperc feletti (30 s-órák) időfelbontása. Jobb felbontás érhető el az NMR-rel követett H/D kicserélődés segítségével történő mérések esetén (ms) (76, 77), azonban itt a fehérjemolekula mérete limitál. A fluoreszcencia (78, 79) és foszforeszcencia (80) kioltási kísérletek esetén a vizsgált fehérje oldalláncnak a kioltó molekula általi elérhetőségét lehet vizsgálni. Az elérhetőséget is a fehérjemolekula egyfajta dinamikus állapota határozza meg, amit ugyanúgy flexibilitásként definiálhatunk. A neutronszórás segítségével a

pikoszekundumos skálán történő mozgásokat is tanulmányozni lehet (81), atomi felbontásban. A kristályszerkezetek B-faktorainak analízise (82) szintén ad dinamikus képet a fehérjemolekula atomjairól.

Figyelembe véve a fellelhető technikákkal kapott eredményeket a flexibilitás-stabilitás-aktivitás összefüggérendszerében azonban nem kaphatunk egyértelmű választ arra a kérdésre, hogy a flexibilitás közvetlenül befolyásolja-e a fehérjék stabilitását, az enzimek aktivitását. A ps és ms időskálán végzett mérések szerint a termofil és mezofil enzimek flexibilitása között nem tapasztalható különbség (77, 83), ellenben a nagyobb időskálán végzett mérések azt mutatják, hogy a termofil enzimek konformációs flexibilitása szignifikánsan alacsonyabb (52, 58).

Az enzimek aktivitásának hőmérsékletfüggése

A kémiai reakciók hőmérsékletfüggését a korábban már említett Arrhenius-egyenlet írja le, amely szerint a reakciósebességi állandó a hőmérséklet függvényében exponenciálisan növekszik. Az enzimek által katalizált reakciók esetén a sebességi állandót az enzim konformációja és dinamikai sajátosságai módosítják, így a sebességi állandó hőmérsékletfüggésében ezeknek a fizikai tulajdonságoknak a hőmérsékletfüggése is tükröződik. Az enzimek kinetikáját általánosan a Michaelis-Menten kinetika írja le (3):

$$v = \frac{k_{cat} [E_0] [S]}{K_M + [S]} \quad (3)$$

Az enzimek hatékonyságát a specificitási konstans (k_{cat}/K_M) értékével szokták jellemezni annak ellenére, hogy abszolút értékben nem használható különböző enzimek aktivitásának összehasonlítására (84). A k_{cat} összetett reakciósebességi állandó hőmérsékletfüggése rendszerint követi az arrheniusi összefüggést, azonban bizonyos esetekben nemlineáris Arrhenius-ábrázolásokat ($\ln k_{cat}$ vs. $1/T$) találhatunk (85, 86). Az eltérést különböző elméletekkel próbálták alátámasztani (87-89), ám ezek nem adnak egyértelműen megbízható magyarázatot a tapasztalatokra. Londesborough (87) korai munkájában az Arrhenius-ábrázolásban található görbületek és törések eredetét vizsgálta. Megállapította, hogy a töréseket a görbuletektől csak nagyon precíz kísérletekkel lehet elkülöníteni. Az Arrhenius-ábrázolás törését kialakító modelleket javasolt, a szolubilis enzimekre alkalmazható módszerében az entalpia-entrópia kompenzációra alapozza elméletét. Demchenko (88) összefoglalójában a nemarrheniusi viselkedés lehetséges okaiként a reakciómechanizmus, illetve a sebességmeghatározó lépés változását, a fehérje konformációváltozását, illetve az

entalpia-entrópia kompenzációt is vizsgálta, azonban a fehérjedinamika és a katalízis csatoltságát, illetve a csatoltság hőmérsékletfüggését jelölte meg a nemarrheniusi viselkedés háttérében lévő legvalószínűbb okként. Truhlar és Kohen (89) elmélete a mikrokanonikus sokaság figyelembe vételével a nemarrheniusi viselkedést az előzőektől eltérő módon, energetikai úton értelmezi. Az elmélet szerint a reakcióba lépő molekulák átlagos energiája a hőmérséklet növelésével kisebb mértékben növekedik, mint a rendszerben előforduló összes (reagáló és nem reagáló) molekula átlagos energiája, így a reakció aktiválási energiája csökken. Cornish-Bowden kritikus munkája (90) arra a fontos tényre világított rá, hogy az Arrhenius-ábrázolás a hőmérsékletnek csak nagyon kis tartományára vonatkozik, így az extrapolációk (főleg a tengelymetszetre vonatkozóak) nem tükrözik a valóságot. Az entalpia-entrópia kompenzáció elméletét elvetette (példákkal alátámasztva az elmélet hibáit), mint valódi fizikai jelenséget.

A K_M értékeinek hőmérsékletfüggését keveset vizsgálták. Ha a termék keletkezése a sebességmeghatározó lépés az enzimreakció során, akkor K_M megegyezik a szubsztrát disszociációs állandójával (K_d), amelynek hőmérsékletfüggését a van't Hoff egyenlet írja le. Ha a disszociáció szabadentalpiája állandó, a van't Hoff ábrázolás ($\ln K_M$ vs. $1/T$) lineáris. Amennyiben eltérés található a lineáristól, az a sebességmeghatározó lépés vagy a szubsztrátkötődés mechanizmusának változását jelzi (91, 92). A Michaelis-állandó hőmérsékletfüggése különböző hőmérséklettartományhoz adaptálódott ortológok esetén jelentősen el is térhet (56, 93). A k_{cat}/K_M hőmérsékletfüggésének vizsgálatát egyedi sebességi állandók számolásánál használják, elsősorban proteázok esetén (94, 95).

Irányított és random mutagenézis felhasználása enzimek tervezésében

Az extrém körülményekhez való adaptáció vizsgálata során kísérletileg és statisztikailag megállapított eredmények a gyakorlatban is felhasználhatóak a biotechnológiában. A módszer a természetben fellelhető enzimek mutagenézise, aminek a segítségével aminosavszinten a megkívánt módon módosíthatók a fehérjék. A két lehetséges módszer a random és az irányított mutagenézis. Az irányított mutagenézis során a megismert összefüggéseket felhasználva megtervezett mutációk beépítése történik a fehérjébe, a munkafolyamat alatt a tervezés fázisában számításokkal alátámasztva választják ki a mutációkat, és a kísérletek az elméleti megfontolásokat megerősítik, esetleg cáfolják. Az irányított mutagenézis (96-98) során rendszerint a megcélzott feladat valamely fehérje hőstabilitásának növelése volt, mivel a biotechnológiában hasznos folyamatok jellemzően magas hőmérsékleten mennek végbe, és

az ezt elviselő enzimvariánsok létrehozása a cél. A másik megközelítési mód a random mutagenézis vagy irányított evolúció (99). Itt a mutációkat véletlenszerűen viszik a DNS-be (100), és a mutáns fehérjéket mesterséges evolúciós nyomással szűrnek a megkívánt változást figyelembe véve. A többlépcsős folyamat eredményeképpen a mutánsok szekvenciáját utólag ellenőrzik, és a változásokat megmagyarázzák az addigi ismeretanyag felhasználásával, továbbá azt bővítik is az új felfedezésekkel. Az irányított evolúciós megközelítés rendszerint jobban felhasználható eredményeket biztosít, azonban jóval munkaigényesebb, nagy mértékű beavatkozás esetén célszerű használata. Kisebb várható hatású mutációk hatását egyszerűbb az irányított mutagenézis módszerét felhasználva vizsgálni.

A konformációs flexibilitás módosítása mutagenézis útján

A konformációs flexibilitás szerepe az enzimek aktivitásában és stabilitásában még nem tökéletesen megoldott feladat. Egy kiegészítő adalék lehet az irányított mutagenézissel végrehajtott direkt flexibilitásváltoztatás. Ennek egy lehetséges módszere a prolinok és glicinek szubsztitúciója, ami a hideghez való adaptációban szignifikáns szerepet játszik (33, 101).

A fehérjealkotó aminosavak közül a prolin egyedülként gyűrűt tartalmaz, mely öttagú, így a N-Cα kötés körüli szabad rotáció akadályozott. A prolint tartalmazó peptidkötés konformációs lehetőségeit ez jelentősen lecsökkenti, a Φ -szögnek $-63^\circ \pm 15^\circ$ értékhatárt adva. A glicin ezzel ellentétben legkisebb méretű oldalláncának (H-atom) köszönhetően a legnagyobb konformációs szabadságot biztosítja a peptidkötés számára. A prolin merevségének köszönhetően növeli a fehérjemolekula stabilitását, valamint nagy szerepe van a konformációs flexibilitás csökkentésében, vagyis a molekula rigiddé tételében. Mindez általában növeli az enzim optimális hőmérsékletét. Ez összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy a termofil enzimek több prolint tartalmaznak, mint mezofil homológjaik. Az irányított mutagenézis rutinmódszerré válása óta folyamatosan történnek próbálkozások a prolin és glicin ellentétes tulajdonságainak kiaknázására. A kísérletek általában azt mutatták, hogy a prolinnak glicinre való cseréje rendszerint az enzim stabilitásának csökkenését, és specifikitásának olyan irányú változását eredményezte, ami a megnőtt flexibilitás következménye (102-104). A szakirodalomból a flexibilitási mutációk additív hatásának leírása hiányzik, továbbá csak feltételezések vannak arról, hogyan lehet az enzim specifikus aktivitását flexibilitási mutáció révén módosítani.

Modellenzimek

A hő- és hidegadaptáció megértése érdekében olyan modellenzimekre van szükség, amelyeket ezekhez a természeti viszonyokhoz alkalmazkodott, alacsonyabbrendű organizmusokban is megtalálhatunk. A modellfehérjéknél fontos szempont még a könnyű előállíthatóság, vagyis a rekombináns enzim natív formában egy egyszerű prokarióta expressziós rendszer segítségével nagy mennyiségben, jól tisztítható módon előállítható legyen.

A megfontolások alapján választásom két enzimre esett, amelyek egyaránt több alegységből álló dehidrogenázok.

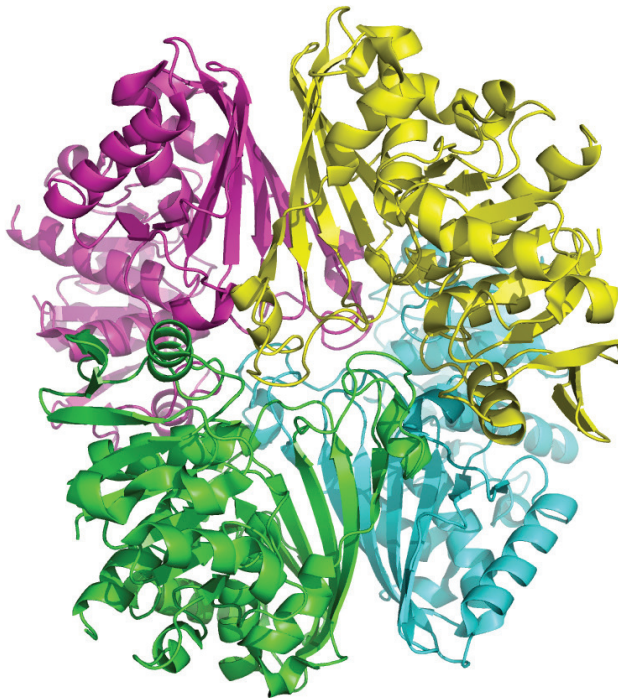
A gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) az anyagcsere egyik legfőbb útvonalának, a glikolízisnek egyik enzime, ami feltehetően a szervezetben hosszú ideje nagy mennyiségben való jelenléte miatt további funkciókat is elnyert. Ez az enzim gyakorlatilag minden élőlényben előfordul, szerkezeti szerveződése azonban nem mutat jelentős differenciákat.

A második modellenzim az izopropilmalát dehidrogenáz (IPMDH), amely alacsonyabbrendű élőlényekben (archeák, eubaktériumok) és növényekben fordul elő, a gerincesekben, így emberben nem.

GAPDH

A GAPDH (EC: 1.2.1.12) a glikolízis 6. lépését katalizálja, a régen jól ismert és fontos metabolikus funkcióján kívül rendkívül sok egyéb funkció is kapcsolódik hozzá. Az utóbbi időben egyre több új területen ismerték fel szerepét: többek között a transzkripció aktivációjában (105), az apoptózisban (106), az endoplazmatikus retikulum-Golgi vezikulum transzportban (107).

A GAPDH homotetramer felépítésű enzim, az alegységek egy NAD-kötő és egy katalitikus doménből épülnek fel (4. ábra) (108).



4. ábra: A GAPDH tetramer szerkezete

A NAD kötődése konformációs változást okoz (109), a további alegységekhez történő NAD-kötődés alacsonyabb affinitással történik, ami a négy alegység közötti negatív allosztériát eredményezi (110). A NAD kötődését a konformációs flexibilitás csökkenése is kíséri. Tömegspektrometriával követett H/D kicserélődés vizsgálatok során kimutatták, hogy a GAPDH dinamikája az egyes NAD koenzimek kötődése folyamánként fokozatosan lecsökken (111). A csökkenés az első NAD molekula kötődésekor a legjelentősebb, a második és harmadik kötődési eseménykor már kisebb a változás, míg a negyedik koenzim kötődése már nem okoz változást a fehérje dinamikájában.

A GAPDH-t számtalan különböző organizmusból izolálták, köztük egy extrém hőstabil változatát a *Thermotoga maritima* eubaktériumból (112). A fehérje kristályszerkezetét néhány évvel később megoldották (113), a fehérje hőstabilitásához a nagyszámú sóhid hozzájárulása a legfontosabb. A GAPDH által katalizált oxidációs reakció során az aktivációs energia a

hőmérséklet növelésével csökken, és a H/D kicserélődési vizsgálatok alapján szobahőmérsékleten az enzim jóval rigidebb, mint az élesztő GAPDH (112). A TmGAPDH szobahőmérsékleten limitált flexibilitással rendelkezik, a közeli UV-CD és fluoreszcencia spektrumok a hidrofób magban az aromás oldalláncok szoros pakolására utalnak. A fluoreszcencia hőmérsékletfüggése rendellenes: a hőmérséklet növelése hatásra a fehérjék fluoreszcencia spektruma vöröseltolódást szokott mutatni az aromás oldalláncok mobilitásának és hozzáférhetőségének növekedése miatt, a TmGAPDH esetében viszont kismértékű kékeltoadást tapasztaltak, ami az aromás oldalláncok korlátozott flexibilitására és a hidrofób kölcsönhatás további erősödésére utal.

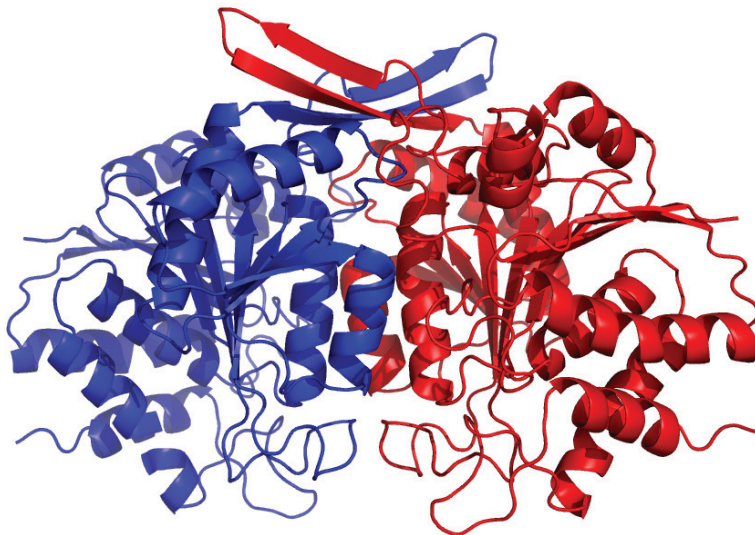
A nyúlizom GAPDH egy célszerűnek tűnő kontrollfehérje. A térszerkezete ismert (114), így az eredmények értelmezése ennek ismeretében lehetséges.

IPMDH

Az IPMDH (EC: 1.1.1.85) a leucin bioszintézisének utolsó előtti lépését katalizálja, a (2R,3S)-3-izopropil-almasav (IPM) átalakítását 2-keto-izokapronsavvá, amihez kofaktorként NAD⁺-ot és egy kétértékű kationt, elsősorban Mn²⁺-t használ.

A PDB adatbázisban nyolc különböző fajból származó IPMDH szerkezete szerepel: *Thermus thermophilus* (115), *Thiobacillus ferrooxidans* (116), *Bacillus coagulans* (117), *Thermotoga maritima*, *Salmonella typhimurium* (118), *Escherichia coli* (118), *Sulfolobus tokodaii* and *Mycobacterium tuberculosis* (119). Az IPMDH enzimek homodimer felépítésűek, az alegységek két doménből épülnek fel, az első domén tartalmazza az N- és C-terminálist, míg a másik domén alakítja ki az alegységek érintkezési felületét (5. ábra).

A két domént egy tíz szálból álló β -lemez kapcsolja össze. Az IPMDH alegységeinek érintkező régiója mindkét alegység g és h héliceiből áll, ami egy négy hélixet tartalmazó köteget alkot, továbbá egy karszerű régióból, amely a másik alegységnek ugyanazon régiójával van kölcsönhatásban, és egy antiparallel β -lemezt alkot, amely a K és L β -szálakból áll. Az aktív hely a két domén közötti hasadékban található, mindkettő monomer részt vesz kialakításában. A koenzim az első doménhez kötődik, míg a szubsztrát kötődéséhez a két alegységhez tartozó egyes és kettes domének (1. alegység 2. domén + 2. alegység 1. domén, ill. 1. alegység 1. domén + 2. alegység 2. domén) térbeli közeledése szükséges.



5. ábra: Az IPMDH dimer molekula szerkezete

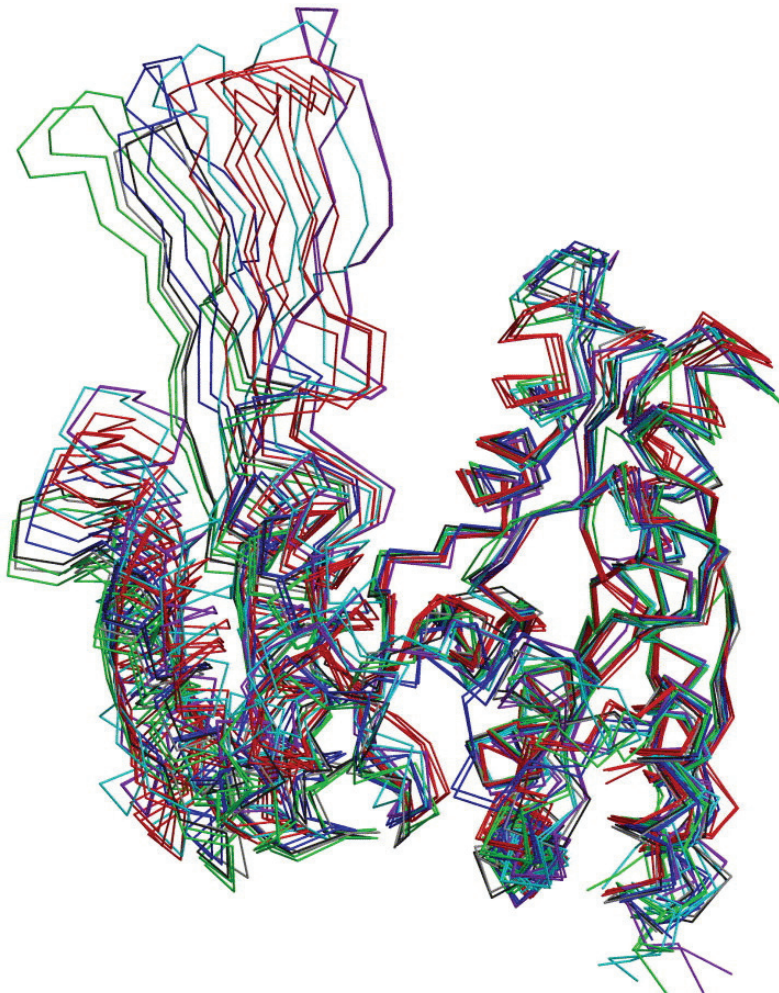
Munkám során a *Thermus thermophilus*, *Sulfolobus tokodaii* és *E. coli* és *Vibrio sp.* 15 IPMDH kinetikai és fizikai jellemzését végeztem el, a hőmérsékletfüggésre kiemelt szerepet szabva. A *ThIPMDH* a hőstabil enzimek egyik prototípusa (120, 121), kinetikai és szerkezeti (115) szempontból alaposan vizsgálta Tairo Oshima kutatócsoportja, a fő szempont a hőstabilitás szerkezeti alapjainak felderítése volt (122, 123), illetve később random mutagenézis kísérletek során az aktivitásprofil alacsonyabb hőmérséklet irányába történő elmozdítását vizsgálták részletesen (124, 125). A termoacidofil *SrIPMDH*-t a később felfedezett enzimek közé tartozik, a legmagasabb hőmérsékleten élő organizmusból izolált jellemzett IPMDH, jelentősége leginkább ebben rejlik (126). Az *EcIPMDH* enzim a *ThIPMDH* hőstabilitásának vizsgálata során mint kontroll merült fel először (127), jellemzése a kristályszerkezet megoldása (118) után folytatódott (128, 129). Az északi sarki vizekben élő baktériumból izolált *ViIPMDH* szerkezetéről csak egy homológiamodell állt rendelkezésre (130).

A szerkezetek ismerete alapján kijelenthető, hogy a különböző IPMDH-k egymásra nagyon hasonlítanak (*Ec*IPMDH vs *Tt*IPMDH CaRMSD=1,8 Å), ugyanakkor kinetikai és fizikai-kémiai sajátosságai között nagy különbségek vehetők észre.

A *Tt*IPMDH által katalizált reakció kinetikájára Dean és Dvorak random kötődési mechanizmust javasolt (131), amely a NAD-dal együtt kristályosított szerkezetével összhangban volt (132). A NAD kötődése olyan állapotot eredményezett, ami a nyílt és zárt konformáció között helyezkedik el. Egy későbbi kísérletsorozatban Kadono és munkatársai röntgenkristallográfiai és kisszögű röntgenszórással kapott eredményei megerősítették ezt (133), és igazolták, hogy a szubsztrát és koenzim együttes kötődése során a szerkezet zárt, míg külön-külön kötődésük különböző, a nyílt és zárt konformáció közötti átmeneti állapotot mutat, tehát a koenzim és szubsztrát egymástól függetlenül tud kötődni az enzimhez. A szubsztráttal együtt kristályosított szerkezet tanúsága szerint az előző adatoktól némileg eltérően teljesen zárt konformáció alakul ki (116).

A *Mycobacterium* IPMDH szerkezetének közlése során arra hívta fel a figyelmet Singh, hogy a nyitott-zárt konformációk között nem lelhető fel éles átmenet, a különböző publikált szerkezeteket összerendezve a konformációs állapotok folyamatos átmenetet mutatnak (119). Ezek alapján erősen feltételezhető, hogy az állapotok között dinamikus egyensúly van, és a rendszer paraméterei (szubsztrát, koenzim jelenléte, pH, ionerősség, hőmérséklet) az egyensúlyt különböző mértékben modulálják csak, nem egyértelmű állapotok közötti diszkrét átmenetéről beszélhetünk (6. ábra).

A konformációs flexibilitás szerepét kutatócsoportunk korábban ezen a modellen zimen vizsgálta (58). A *Tt*IPMDH és *Ec*IPMDH konformációs flexibilitását megvizsgálva arra a következtetésre jutottak, hogy bár szobahőmérsékleten a mezofil enzim jóval flexibilisebb, azonban az egyes enzimek optimális működési hőmérsékletén megvizsgálva ugyanezt, az a tapasztalat, hogy a konformációs flexibilitásuk megegyezik, így kijelenthető volt, hogy a konformációs flexibilitás beállítása kulcsszerepet játszik a fehérjék hőadaptációjában.



6. ábra: A különböző IPMDH szerkezetek összerendezése a domének egymáshoz való elmozdulása szerint folyamatos átmenetet mutatnak a nyitott és zárt állapotok között (119).

Célkitűzés

Az enzimek működésében két ellentétes hatású fizikai jelenségnek, a szerkezeti stabilitásnak és a konformációs flexibilitásnak finoman összehangolt egyensúlyára van szükség. Az enzimek aktivitásához szükség van konformációs mozgásokra, viszont a natív szerkezetük fenntartása is elengedhetetlen kritérium. Az enzimek rendkívül érzékeny objektumok, csak igen szűk hőmérséklettartományban működnek. Azonos funkciójú, de különböző hőmérsékletre alkalmazkodott enzimek összehasonlító vizsgálata segítségével a flexibilitás, stabilitás és aktivitás közötti összefüggések alaposabban vizsgálhatóak. Munkám során a katalizált reakciók és katalizátoraik konformációs flexibilitásának hőmérsékletfüggését vizsgáltam. Fő célom az enzimaktivitás és a konformációs flexibilitás közötti összefüggések részletes megértése volt. Vizsgálati objektumként két dehidrogenázt, a GAPDH-t és az IPMDH-t választottam.

- A GAPDH enzimek mezofil és termofil változatának vizsgálata során arra kerestem a választ, hogy miként valósul meg a magas hőmérsékletre való alkalmazkodás az enzimek konformációs flexibilitásában és stabilitásában.
- Az IPMDH enzimváltozatok hőmérsékleti adaptációját megvizsgálva kerestem arra a kérdésre a választ, hogy mennyire tekinthető általánosnak az a megfigyelés, hogy a konformációs flexibilitás beállítása a hőmérsékleti adaptáció fő stratégiája, vagy egyéb alkalmazkodási lehetőségek is megvalósulnak.
- Megfigyelésünk szerint az *E. coli* IPMDH által katalizált reakcióban a szubsztrátra vonatkozó Michaelis-Menten állandó hőmérsékletfüggésének van't Hoff ábrázolása szigmoid lefutást mutat. Arra a kérdésre kerestem a választ, hogy milyen fizikai kölcsönhatások következménye ez a korábban nem tapasztalt hőmérsékletfüggés. Feltételezésünk szerint a fehérje dinamikájának hőmérsékletfüggő változásai okozhatják a változást, kísérleteimmel a változás pontos okát kerestem.
- Korábbi tapasztalatok szerint a nagyobb flexibilitással rendelkező enzimek rendszerint nagyobb enzimatisz aktivitással rendelkeznek. Arra a kérdésre is választ kerestem, hogy egy enzim konformációs flexibilitásának megnövelése célzott mutációkkal milyen hatást gyakorol az enzim aktivitására.

Anyagok és módszerek

Ebben a fejezetben nem a „hogyan?” kérdésre szeretnék válaszolni az egyes módszereket illetően, mivel a molekuláris biológiai és fehérje-biokémiai módszerek az olvasó számára ismertek, legfeljebb a „miért?” kérdésre próbálok választ adni, tehát megmagyarázni, hogy az adott módszert miért használtam, illetve miért az adott módszert használtam. Talán megbocsátható ez a megközelítés.

DNS munka

A munka során különböző organizmusokból származó IPMDH és GAPDH fehérjékkel dolgoztam. A GAPDH esetén ez részben vásárolt, illetve mások által előállított fehérjével való munkát jelentett, ezzel az Anyagok és módszerek részben nem foglalkozom. A három, különböző hőmérséklethez adaptálódott IPMDH enzimet egyaránt heterológ, *Escherichia coli* expressziós rendszerben rekombináns formában állítottam elő, továbbá a *Sulfolobus tokodaii* IPMDH enzimet Chie Motonotól (Tokyo University of Pharmacy and Life Science) kaptam. A három rekombináns változat esetében már korábbi munkák alapján rendelkezésre állt a megfelelő termelő konstrukció, azonban ezek különböző, és nem megfelelő hatékonyságú expressziós rendszerek mind expressziós hatékonyság, mind a fehérje tisztíthatóságát illetően. Munkám kezdeti időszakában a rendelkezésre álló rendszereket használtam, de a továbbiakban későbbi ismereteimet felhasználva a három fehérjét egységes expressziós rendszer segítségével termeltettem.

A kiindulási konstrukciók TtIPMDH esetén a pUC118 vektorba PstI-KpnI helyen klónozott leuB gént tartalmazó pUTL118, EcIPMDH esetén a pBluescript vektorba PstI-KpnI helyen klónozott leuB gént tartalmazó pWally, ViIPMDH esetén a pUC18 vektorba BamHI helyen klónozott leuB gént tartalmazó pGWII voltak. A gazdasejtvonalak pUTL118 esetén BMH 71-18, pWally esetén RDK1782, míg pGWII esetén OM17 (leuB deficiens JM105 változat).

A módosított konstrukciók elkészítéséhez pET21c vektort használtam, kihasználva a C-terminális 6XHis-tag affinitásjelölőcsoport bevitelét. A három gént a szokásos DNS technológiai módszerek segítségével NheI-NotI helyre szubklónoztam, majd gazdasejtként az *E. coli* BL21 (DE3) pLysS sejtvonalat használtam.

Irányított mutagenézis

A mutagenézist a Stratagene cég QuikChange® kitje segítségével, a leírás szerint végeztem. Templátként a TtIPMDH enzimet kódoló gént tartalmazó eredeti pUTL118 konstrukciót használtam. A mutagenézis eredményességének előzetes tesztelésére a mutagenézishez használt oligonukleotid segítségével restrikciós profilt megváltoztató, azonban a kifejezett fehérjében nem jelentkező csendes mutációt is terveztem: így egy egyszerű restrikciós emésztés segítségével a mutáció megtörténtét az akkoriban lassú és költséges szekvenálás előtt meg tudtam állapítani. Természetesen a szekvenálás is szükséges volt a mutáció validálására, azonban ez már csak az előzetesen jónak talált klónok vizsgálatát jelentette, amelyet külső helyen végeztek (MTA SZBK Szeged, MBK Gödöllő). A felhasznált oligonukleotidok a következők voltak (piros színnel a tényleges, kékkel a csendes mutációhoz szükséges módosításokat jelöltem):

Szekvencia	Mutáció	Restrikciós enzim
5'-CCT TGG GAA GGG GAA CCG GGG TCT TTG AGC CCG 5'-CGG GCT CAA AGA CCC CGG TCC CCC TTC CCA AGG	P267G	BanI
5'-CG CCT ACG AGG TGT TCG GCT TCG GCG GGG CG 5'-CGC CCC GCC GAA GCC GAA CAC CTC GTA GG	P40G	BpiI
5'-C CTT CCC CGA GGG CAC GCG TAA GGG CGT GG 5'-C CTC CAC GCC CTT ACG CGT GCC CTC GGG GAA GGG	P56G	MluI
5'-GGA GAC CCC GCC CGG GGA CCT CGG AGG AAG 5'-CTT CCT CCG AGG TCC CCG GGC GGG GTC TCC	P325G	SmaI
5'-CG CCT ACG AGG TGT TCC TCT TCG GCG GGG CG 5'-CGC CCC GCC GAA GAG GAA CAC CTC GTA GGC G	P40L	BpiI
5'-CC CTT CCC CGA GGA GAC GCG TAA GGG CGT GGA GG 5'-C CTC CAC GCC CTT ACG CGT CTC CTC GGG GAA GGG	P56E	MluI

Fehérjeexpresszió

A fehérjeexpresszió során a további kísérletekhez esszenciális fehérjék termelése történik meg nagy mennyiségben. Fontos cél, hogy a kívánt célfehérje homogén és natív állapotban keletkezzen, illetve a minél jobb kitermelés sem másodlagos. Az egységes expressziós rendszer alkalmazása ez utóbbiban segít, mivel a kimondottan expresszióra ajánlott pET vektorok felhasználásával sokkal szigorúbban szabályozható a fehérjeexpresszió, így indukció

előtt gyakorlatilag nem keletkezik a baktérium számára nagy mennyiségben mindenképpen felesleges fehérjetermék, így a sejtek mennyisége az expresszió során magasabb értékek érhet el, ekképpen a termelhető fehérje összmennyisége is nagyobb lesz. A pET rendszer előnye még, hogy a sejtek számára toxikus fehérjék termelését is lehetővé teszik a konstitutív expresszió visszaszorítása révén, bár erre munkám során nem kellett törekednem. A munkámhoz használt fehérjék expresszióját a következő módon hajtottam végre:

TtIPMDH (pUTL118):

A plazmiddal transzformált BMH 71-18 sejtvonalat rázótermosztátban 100 µg/ml ampicillin jelenlétében 200 rpm rázatás mellett 37 °C-n 3 órán át növesztettem ($OD_{600nm}=0,3$ -ig), majd 0,1 mM IPTG-vel való indukció után további 12 órán át növesztettem.

ViIPMDH (pGWII):

A plazmiddal transzformált OM17 sejtvonalat rázótermosztátban 100 µg/ml ampicillin jelenlétében 200 rpm rázatás mellett 37 °C-n 3 órán át növesztettem ($OD_{600nm}=0,3$ -ig), majd 0,1 mM IPTG-vel való indukció után további 12 órán át növesztettem.

EcIPMDH (pWally)

A plazmiddal transzformált *E. coli* RDK1782 sejtvonalat 30 °C-on növesztettem 100 µg/ml ampicillin és 50 µg/ml koncentrációjú kanamicin jelenlétében. A logaritmusos fázisban ($OD_{600nm}=0,4$) hőindukáltam 42 °C-on, 1 órás indukció után tovább növesztettem a sejteket 3 órán át, 37 °C-on.

pET21c alapú plazmidok (mindhárom konstrukció)

A plazmiddal transzformált BL21 (DE3) pLysS sejtvonalat rázótermosztátban 100 µg/ml ampicillin jelenlétében 250 rpm rázatás mellett 37 °C-n 3-4 órán át növesztettem ($OD_{600nm}=0,6$ -ig), majd 0,4 mM IPTG-vel való indukció után további 4 órán át növesztettem.

Mutáns enzimek expressziója

A mutáns enzimek expressziója a vad típusú TtIPMDH expressziójával megegyezett.

Feldolgozási műveletek

A bakteriális expressziós rendszerekben termelt fehérjék esetén a feldolgozás a kultúrák centrifugálásával kezdődött, melyet Beckman Avanti centrifugán JA-10 rotorban 5000 rpm-n 4 °C-n 15 percig végeztem. A lecentrifugált sejtmasszát lefagyasztottam, majd kiolvasztás után a sejteket ultrahangos szonikáló berendezéssel roncsoltam. A sejttermék centrifugálással (Beckman Avanti centrifuga JA-10 rotor 17000 rpm-n 4 °C 17 perc) választottam el a felülúszótól, ami az enzimeket tartalmazta. A további lépések a régi és új konstrukciók különbözőek voltak, ezeket tagolva tárgyalom.

Eredeti konstrukciók és mutáns IPMDH változatok

A sejtmentes felülúszót a hőstabil enzimek esetén 60 °C-os hődenaturációnak vettem alá, ami növeli a célfehérje tisztaságát a bakteriális gazdafehérjék denaturációja miatt. Természetesen ezt a lépést az *EcIPMDH* és *ViIPMDH* esetén kihagytam. A második lépés DE52 oszlopon (DEAE-cellulóz) végzett anioncsere volt, ami a felülúszóban található nagy mennyiségű kismolekula eltávolítására, valamint a célfehérje dúsítására alkalmas. A harmadik lépésként ammónium-szulfátos kicsapást használtam, ami után a hidrofób kromatográfia következett (Butyl-Sepharose). Az ezt követő újabb anioncsere (DEAE-Sepharose) már elég nagy tisztaságú fehérjét eredményezett, azonban polírozó lépésként még géliszűrés volt szükséges (Sephacryl S-200). A hatlépéses tisztítás után 95-98% tisztaságú fehérjét kaptam, ami a kísérleteimhez megfelelő volt. A tisztítás jelentős hátránya volt a kiindulási kisebb fehérjemennyiség, a tisztítási módszer hosszadalmassága és az eredő alacsony kitermelés. Legfőképpen ezek irányítottak a pET rendszer kínálta előnyök felé.

Új konstrukciók

A pET rendszerben termelt fehérjék esetén a sejtfehérúszó Ni-NTA Superflow oszlopon tisztítottam, itt egy lépés elegendő volt a korábbi 95%-os tisztaság eléréséhez.

Az anyagmérleget megvonva jellemzően a kiindulási állapot esetén 2 hét alatt 6L tápoldatból 20 mg fehérjét kaptam, míg a módosított rendszerben három nap alatt 1L tápoldatból 100 mg fehérje volt az eredmény. Persze felvetődhetne a kérdés, hogy miért nem elég a 20 mg, de a fizikai-kémiai méréseimhez igen nagy mennyiségű fehérjére volt szükségem, ezért szükséges volt a módosítás.

Enzimaktivitás mérése

Az enzimaktivitásmérések a munka esszenciális részét képezték. A különböző hőmérsékletekhez adaptálódott enzimek esetén a méréseket is igen széles hőmérséklettartományban kellett vizsgálni, ami a 3 és 80 °C közötti intervallumot jelentette. Alacsony hőmérsékleten a párasodást N₂-áramoltatással kellett kivédeni (kb. 15 °C-ig), magas hőmérsékleten pedig a reakció során történő gázképződés hatását kellett korrigálni. Egyéb apró paraméterekre is figyelni kellett, így a pH-t mindig az adott mérés hőmérsékletére kellett beállítani (korrekciós előkísérletek alapján). A méréseket mindkét enzim esetén optikai úton, Jasco V-550 spektrofotométer segítségével követtem, a reakciókat kvarcküvetében hajtottam végre.

IPMDH

Az enzimaktivitásméréseket 14 és 80 °C között hajtottam végre a négy enzim esetén 3 °C lépésközzel. Az aktivitásmérések felső határát az enzimek denaturációs hőmérséklete határozta meg, így ViIPMDH esetén 59 °C, EcIPMDH esetén 65 °C volt a felső határ, míg a két termofil enzim esetén a teljes skála használható volt. A flexibilitási mutáns enzimek esetén 20 és 80 °C között 5 °C lépésközt használtam. A mérésekhez felhasznált puffer összetétele: 20 mM KH₂PO₄, 300 mM KCl, 0,2 mM MnCl₂ pH 7.6. A szubsztrát és koenzimkoncentrációt úgy állítottam be, hogy lehetséges legyen az enzimkinetikai paraméterek (k_{cat} , K_M) meghatározása, ehhez egy hőmérsékleten 4 szubsztrát- és 4 koenzimkoncentrációt használtam, az ekképpen kapott 16 mérési pontból nemlineáris illesztéssel határoztam meg a enzimkinetikai paramétereket. A szubsztrátkoncentráció (DL-treo-izopropilalmasav) 10-600 μM, a koenzimkoncentráció (NAD⁺) 20-1000 μM között változott. A szükséges enzimmennyiség hozzáadásával indítottam a reakciót, amelyet mindig igyekeztem úgy beállítani, hogy a kezdeti sebességet a lehetőségek szerint pontosan le tudjam olvasni. A reakció folyamán az optikailag követhető jel a keletkező NADH 340 nm-n detektálható abszorpciója volt (58).

GAPDH

Az enzimaktivitásméréseket 3-40 °C (nyúl), illetve 5-75 °C (*Thermotoga maritima*) között végeztük el 7 hőmérsékleten. Az enzimreakció során a gliceraldehid-3-foszfát oxidációját

vizsgáltuk, spektrofotometriásan a keletkező NADH abszorbanciáját detektáltuk 366 nm-en. A reakciópuffer 50 mM Teorell-Stenhagen puffer volt (pH=8,5) kiegészítve 10 mM kálium-dihidrogén-arsenáttal, valamint változtatott mennyiségű koenzimmel (NAD^+) és szubsztráttal (gliceraldehid) (112). A reakciósebességi állandót (k_{cat}) a korábban ismertetett módon határoztuk meg.

CD spektroszkópia

A CD méréseket *Jasco J-720* spektropolariméterrel végeztük. A műszer egy *Neslab RTE-110* számítógéppel vezérelhető termosztáttal kiegészítve lehetővé tette a hőmérséklet pontos beállítását és a hődenaturációs kísérletekhez szükséges folyamatos felfűtés megvalósítását. A vizsgált hullámhossztartománynak megfelelően 0,1 (távoli-UV) és 5,0 cm-es (közele-UV) úthosszúságú, hengeres, termosztálható kvarcküvetákat használtam. A hőmérsékletbeállítás pontossága ± 0.1 °C. A fűtési sebesség 50 °C/óra volt. Az alkalmazott fehérjekoncentráció a küvetától és a mérési tartománytól függően 0,1-0,25 mg/ml volt. Az alkalmazott pufferek megfeleltek az enzimaktivitásmérés esetén használtaknál, szubsztrátot és koenzimet nem tartalmazott a minta. A hődenaturációs kísérletekben az átmeneti hőmérsékletet (T_m) a fűtési görbe első deriváltjának maximumértékeként definiáltuk.

DSC

A differenciális pásztázó kalorimetriai (DSC) kísérleteket *VP-DSC* (Microcal Inc.) műszeren végeztük. 1 °C/perc fűtési sebességeket használtunk. A fehérjekoncentráció 0,2-2 mg/ml volt. Az eredményeket Origin 5.0 programmal értékeltük ki. A hőkapacitásokat a Privalov által javasolt módszerrel számítottuk ki (134). A hődenaturációs átmenetek nagyrészt irreverzibilis volta miatt általában a kalorimetrikus entalpián kívül más mennyiséget nem számoltunk ki. Bizonyos esetekben a van't Hoff entalpia meghatározása információkat szolgáltathat az átmenetek természetét illetően (kétállapotúnak tekinthető-e a rendszer vagy sem), illetve az illesztés során kapott átmeneti hőmérsékleteket pontosabbnak tekinthetjük, mint a nyers hőabszorpciós görbe átmenethez tartozó maximumértékét.

FT-IR mérések

A nehézvízben (D₂O) bekövetkező H/D kicserélődés kinetikáját *Bruker IFS 28* Fourier-transzformációs infravörös spektrofotométerrel követtük (71, 72). A minták és a háttér mérése során átfolyós rendszerű, CaF₂-ből készült, 110 µm úthosszú küvetát használtunk. A hőmérsékletet a küvetta ablakához rögzített szenzorral, egy *Cole-Parmer* digitális hőmérővel mértük. A méréseket 20-80 °C intervallumban végeztük, 3 °C lépésközzel. Alacsonyabb hőmérsékleten technikai okok miatt (a küvetta buborékmentesen nem betölthető) nem végeztünk méréseket. A magas hőmérséklet esetén a CaF₂ fizikai stabilitása jelentett határt. A GAPDH enzimek esetén a méréseket 25 °C-on, valamint *Thermotoga maritima* GAPDH esetén 68°C-on is végrehajtottuk.

Az IPMDH mintákat 20 mM káliumfoszfát, 300 mM KCl pufferoldatban (pH 7,6) dializáltuk, majd liofilizáltuk őket 12 órán keresztül. A GAPDH esetén Teorell-Stenhagen puffert (pH 6,0 és 7,0) használtunk a dialízishez. A liofilizálás során bekövetkező aktivitásvesztés elhanyagolható volt. A dialízispufferekből szintén liofilizálással kaptuk meg a mérendő háttérhez szükséges mintát.

A liofilizált mintát (0,5-1 mg) nehézvízben oldottuk fel. A kicserélődés kezdeti időpontjának a nehézvíz hozzáadását tekintettük. Kb. 30-40 s után, ami a teljes feloldódásra, betöltésre és a mérés elindítására fordítódik, spektrumsorozatot vettünk föl, 4000-400 cm⁻¹ tartományban, kezdetben 10 s-enként (4 scan, zajosabb spektrumok), majd végül a kicserélődés lassulásával összhangban 10 percenként (128 scan, pontosabb mérések). A felbontás 2 cm⁻¹ volt. A mérés során a küvetatartat szártított levegővel, illetve esetenként száraz levegő hiányában folyamatosan nagy tisztaságú nitrogénnel öblítettük, hogy a vízgőz mennyiségét minél jobban csökkentsük a cellatérben. A spektrumokat a mérés után előre felvett vízgőzspektrummal korrigáltuk.

H/D kicserélődés

Az amid-I és amid-II sávok abszorbanciáit maximumuk hullámhosszán (1650 cm⁻¹ ill. 1547,5 cm⁻¹) értékeltük ki, ezt korrigáltuk az 1789 cm⁻¹-en mért háttérrel. A kicseréletlen peptidhidrogének *X* arányát az alábbiak szerint kaphatjuk meg:

$$X(t) = \frac{\omega(t) - \omega(\infty)}{\omega(0) - \omega(\infty)},$$

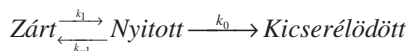
ahol $\omega(t)$ az amid-I és amid-II sávoknak megfelelő abszorbanciák aránya az alapvonal abszorbanciájával korrigálva *t* időpontban:

$$\omega(t) = \frac{A_{\text{amid-II}}(t) - A_{1789}(t)}{A_{\text{amid-I}}(t) - A_{1789}(t)},$$

$\omega(0)$ a nem deuterált fehérje amid-II/amid-I aránya, és $\omega(\infty)$ ugyanez az arány teljesen deuterált fehérje esetén.

$X(t)$ meghatározásához előbb ismernünk kell $\omega(0)$ és $\omega(\infty)$ értékét. $\omega(0)$ -t, a kicseréletlen amid-II/amid-I arányt a fehérje KBr pasztillában ill. nujolban történő mérésével határoztuk meg (58). Alkalmaztunk egy harmadik módszert is, amikor közönséges vízben vettük fel a fehérjék infravörös spektrumát. Ekkor 20 μm vastag küvettát használtunk (a mért tartományban a víz fényelnyelése jelentős). A víz 1650 cm^{-1} körüli HOH deformációs rezgése miatt a háttérhez képest a fehérje térfogata által kizárt víz jelentős „negatív” csúcsként jelentkezett, ezt megfelelően korrigálni csak az amid-II tartományában lehetett. Az amid-I értékét egy azonosan kezelt, ugyanolyan koncentrációjú minta nehézvízben történő méréséből kaptuk. Mindhárom módszer azonos eredményre vezetett, mindegyik enzim esetén egyaránt $\omega(0)=0.65\pm0.02$ értéket kaptunk.

A teljesen kicserélt fehérje $\omega(\infty)$ értékét megemelt hőmérsékleten, D_2O -ban 14 napon át inkubált minták mérésével határoztuk meg. A *Vibrio* sp. IPMDH esetén 30 °C az *E. coli* IPMDH esetén 45 °C, a *Th. thermophilus* IPMDH esetén 65 °C-os inkubációs hőmérsékletet használtunk. A művelet során kicsapódott a fehérje mennyiségének kb. 50 %-a. Ezt a mérés előtt centrifugálással (12000 g, 15 perc) eltávolítottuk. Mindhárom enzimre $\omega(\infty)=0.1\pm0.01$ értéket kaptunk. (*Sulfolobus tokodaii* IPMDH enzimből kevesebb állt rendelkezésre, ott ezeket a kísérleteket nem hajtottam végre, és az IPMDH-kra feltehetően általánosan érvényes értékeket használtam). A GAPDH-k esetén az előkísérleteket elvégezve ugyanezekkel az adatokkal tudtunk számolni. Az eredményeket az EX₂ kicserélődési mechanizmus (71) szerint értékeltem ki, amely feltételezi, hogy az eltemetett labilis hidrogének felszínre hozó fluktuációk gyorsak az oldószernek kitett peptidcsoportok kicserélődési sebességéhez képest. Tehát a kicserélődés:



folyamatában:

$$k_{-1}, k_1 \gg k_0.$$

Ebben az esetben a kicserélődés lefolyását egyidejűleg végbemenő, elsőrendű reakciók soroataként tekinthetjük:

$$X = n^{-1} \sum_{i=1}^n \exp(-\rho_i k_0 t),$$

ahol n a peptidhidrogének száma a fehérjemolekulában, ρ_i pedig annak a valószínűsége, hogy az i -edik peptidcsoport az oldószernek kitett állapotban található. A kémiai kicserélődés k_0 sebességi állandója, a pD és a hőmérséklet függvénye. Modellpeptideken végzett NMR-vizsgálatok alapján a k_0 értéke kis mértékben függ az egyes peptidcsoportok szomszédságában elhelyezkedő oldalláncoktól (135). Az infravörös-spektroszkópia alkalmazásakor az egyes peptidcsoportok nem különböztethetők meg, így k_0 esetében egy átlagos, az alábbi empirikus képlettel meghatározott értéket használtam:

$$k_0 = (10^{-pH_{\text{leolvasott}}} + 10^{-pH_{\text{leolvasott}}-6}) 10^{0.05(T-25)} \text{ s}^{-1},$$

amelyet poli-DL-alanin H/D kicserélődésének mérésével határoztak meg (71). Mivel jelen munka homológ enzimek összehasonlító vizsgálatával foglalkozik, k_0 tényleges értéke nem befolyásolja az eredményeket. A kicserélődés kinetikai adatait az ún. relaxációs spektrum (72) formájában ábrázoltam, ahol a kicseréletlen amidprotonok hányadát (X) $\log(k_0 t)$ függvényében tüntetjük fel

Fluoreszcencia

A fluoreszcenciaméréseket Peltier termosztáttal felszerelt Jobin Yvon Horiba Fluoromax3 spektrofluoriméter segítségével végeztem el, 10*4 mm-es kvarcküvetében. A felhasznált puffer az aktivitásmérésnél is használt foszfátpuffer volt. A méréseket konstans enzimmennyiséggel (150nM) és változó mennyiségű IPM és NADH felhasználásával végeztem. A gerjesztő hullámhossz 275 nm volt, az emissziót 310-500 nm között detektáltam. Az értékelés során Trp emissziós esetén a 310-390 nm hullámhossztartományban, NADH emisszió esetén 390-500 nm tartományban integráltam a fényintenzitást. A méréseket 14-50 °C hőmérséklettartományban 3 °C lépésközzel végeztem el. A mérések kontrolljaként triptofán-oldattal (az IPMDH-oldattal azonos emisszióintenzitású volt) is elvégeztem a NADH által okozott quenching vizsgálatát. A felhasznált matematikai eljárást az eredmények részben ismertetem a jobb áttekinthetőség kedvéért.

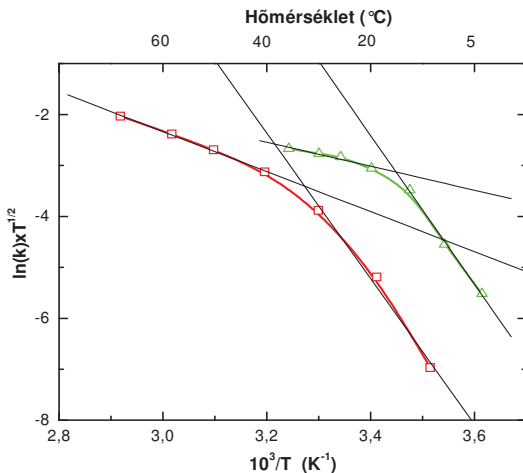
Eredmények és megbeszélés

A GAPDH nemarrheniusi viselkedése

A munkában az enzimaktivitás hőmérsékletfüggésében található rendhagyó viselkedésre próbáltunk szerkezeti magyarázatot találni, ehhez többféle modellenzimet is megvizsgáltunk. A gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) ebből a szempontból megfelelő objektumnak tűnt, mivel egy korábbi cikk alapján (112) tudtunk a nemarrheniusi viselkedésről a *Thermotoga maritima*-ból izolált változat esetén. Mi egy mezofil ortológót is bevontunk a vizsgálatokba (nyúlizom), ami azért is megfelelő választás, mivel mindkét enzim háromdimenziós szerkezete ismert. A vizsgálat célja az volt, hogy a nemarrheniusi viselkedést a konformációs flexibilitás hőmérsékleti változásával összefüggésbe tudjuk hozni, valamint esetleges további szerkezeti magyarázatot találjunk a szerkezetek elemzésével.

A GAPDH enzimatis aktivitásának hőmérsékletfüggése

Mindkét enzim (nyúl, *Thermotoga maritima*) esetében a GAPDH által katalizált gliceraldehyd-3-foszfát oxidációt követtük spektrofotometriai módszerrel. A 7. ábrán a meghatározott k_{cat} értékek hőmérsékletfüggését ábrázoltuk Arrhenius szerint.



7. ábra: A gliceraldehyd-3-foszfát oxidációjának sebességi állandójának hőmérsékletfüggése Arrhenius szerint ábrázolva TmGAPDH (piros négyzet) és RmGAPDH (zöld háromszög) által.

Az Arrhenius-ábrázolás mindkét esetben nemlineáris, jól közelíthető két egymást metsző egyenessel. A töréspont *RmGAPDH* esetén 17°C, míg *TmGAPDH* esetén 35°C-nak adódott. A görbék alapján látszólagos aktiválási energiát is lehet számolni a katalizált folyamatokra. Az értékek *TmGAPDH* esetén 118 kJ/mol illetve 30 kJ/mol a két hőmérsékleti szegmensben, míg *RmGAPDH* esetén 121 kJ/mol és 13 kJ/mol a megfelelő érték. Nyilván ezek az értékek nem individuális sebességi állandókból számolt valódi aktiválási energiaértékek, mindenesetre azért kvalitatív következtetést engednek levonni, amely értelmében az a tapasztalat, hogy a magasabb hőmérsékleten az enzimek által katalizált reakció aktiválási energiája lecsökken, tehát az enzimek „jobbak” lesznek. A törésnek feltételezhetően valamilyen fizikai-kémiai vagy szerkezeti magyarázat állhat a háttérében. A továbbiakban ezt próbáltuk eldönteni.

A GAPDH konformációs változásai

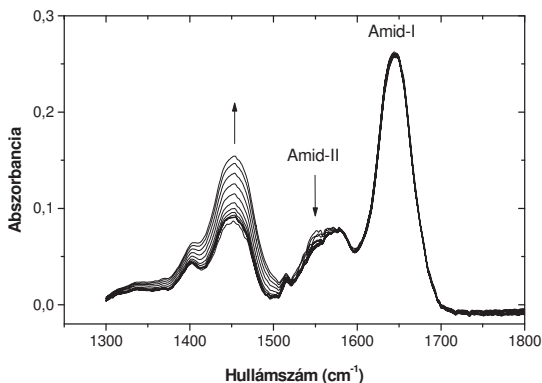
A *TmGAPDH* vizsgálata során *Wrba* és munkatársaihoz (112) az enzimek kinetikai paraméterek meghatározása során nagyon hasonló eredményekhez jutottunk. A CD és fluorimetriás kísérletek alapján eredetileg azt feltételezték, hogy a törés konformációváltozás miatt következik be. Ezt a feltételezést mikrokalorimetriás méréssel ellenőriztük. Amennyiben a töréspont egy makroszkopikus konformációs változással jár együtt, akkor azt hőváltozásnak is kísérnie kell, ezt differenciális pásztázó kalorimetriával vizsgáltuk meg. Mindkét fehérje kalorimetriás görbéje egy kompakt, natív fehérjére jellemző volt, egy határozott csúccsal, ami a fehérje denaturációját jelzi. A denaturációs hőmérsékletek *RmGAPDH* esetén 66°C, míg *TmGAPDH* esetén 102°C volt. Ezek alapján joggal feltételezhettük, hogy az aktivitás kritikus hőmérsékleti tartományában jelentős konformációváltozás nem következik be. Alacsony hőmérsékleten lehetséges lehet hidegdenaturáció vagy az alegységek disszociációja, azonban kísérletek szerint ez nem következik be (136). Ha figyelembe vesszük, hogy az enzimek konformációja és negyedleges szerkezete a hőmérséklet függvényében nem változik, de az aktivitás mégis jelentősen lecsökken, a konformációs dinamika változása magyarázatot jelenthet.

A GAPDH konformációs flexibilitása

Mivel kísérletsorozataimban a konformációs flexibilitás követése meglehetősen kiemelt helyet foglal el, és a detektálási módszere sem rutin eljárás, ezért ezt részletesebben mutatom

be. A fehérjemolekulák konformációs flexibilitása állandó és folyamatos fluktuációk összességét jelenti. Ezek a lokális átrendezések reverzibilisek, nemkooperatívak, detektálásukra az ad lehetőséget, hogy a polipeptidlánc elemeinek oldószer általi elérhetőségét hosszabb-rövidebb lehetővé tesszik. Az általunk használt kísérleti elrendezésben a liofilizált, vízmentes fehérje nehézvízbe helyezése során az oldószer által elérhető amidhidrogének deutériumra való kicserélődését tudjuk követni. Az FT-IR módszerrel a peptidhidrogének hozzáférhetőségének valószínűségi eloszlását határozhatjuk meg. Az eloszlási függvény a kicserélődési relaxációs spektrum. A módszer hiányosságaként megemlíthető, hogy a felszínen található protonok gyors kicserélődésük miatt láthatatlanok, az oldószer számára legfeljebb 10^{-1} - 10^{-2} valószínűséggel hozzáférhető protonok jelentik a detektálási limitet, amelyeknek kicserélődési kinetikáját követni lehet.

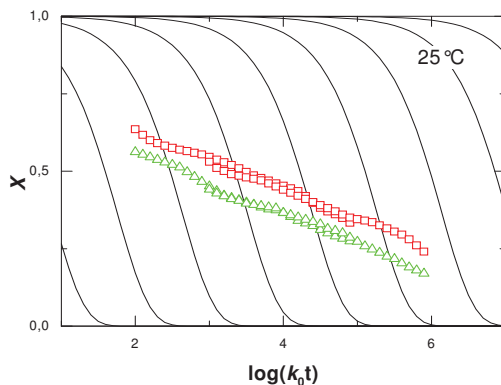
A H/D kicserélődés időbeli lefolyásának FT-IR spektroszkópiával való követésének elvi lehetőségét a 8. ábra mutatja be.



8. ábra: Egy jellegzetes H/D kicserélődési kísérlet nyúlizom GAPDH esetén. Az amid-II sáv (1550 cm^{-1} -nél) csökkenése az amid-protonok csökkenő arányára utal. Az 1450 cm^{-1} -nél megfigyelhető sáv az N-D és HDO molekulák növekvő számát mutatja. A nyilakon a változások irányát tüntettem fel.

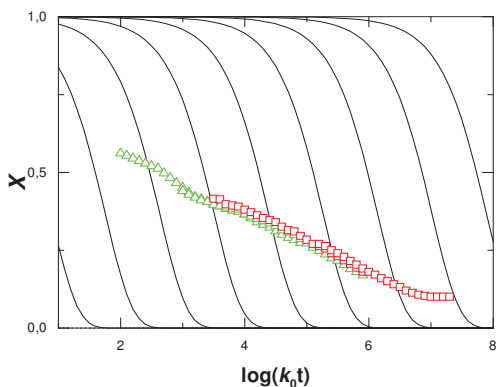
Az ábrán IR spektrumok egy sorozatát mutatom be egy kísérlet folyamán, feltüntetve a teljesen kicserélt és a kicseréletlen fehérje spektrumát is. Az 1650 cm^{-1} környéki abszorbanciasáv az amid-I sáv, az 1550 cm^{-1} környéki abszorbanciasáv az amid-II sáv. Az amid-I sáv a C=O síkban megnyúló (in-plane stretching) rezgéséből származik, ami gyengén

csatolódik a C-N megnyúló és a N-H síkban meghajló rezgésével. Az amid-II sáv a C-N megnyúló rezgésével erős csatolásban levő, síkban meghajló N-H rezgéssel kapcsolatos. Az amid-I sáv intenzitása a H/D kicserélődés kísérlet folyamán állandó, míg az amid-II sáv intenzitása a kicserélődés előrehaladtával csökken, mivel az N-H \rightarrow N-D változás hatására a rezgésre jellemző sáv eltolódik 1450 cm^{-1} környékére. A kicseréletlen peptidhidrogének aránya az idő, a pD és a hőmérséklet függvényében kiszámítható. Az eredményeket az EX₂-mechanizmus feltételezésével értelmeztük, vagyis azzal a feltevéssel, hogy az eltemetett hidrogénatomokat felszínre hozó fluktuációk gyorsak az oldószernek kitett peptidcsoportok kicserélődési sebességéhez képest. Az adatokat az *Anyagok és módszerek* részben leírt módon értékeltem. A relaxációs spektrumok valószínűségi eloszlást tükröznek. Az ábrákon a vékony vonalak hipotetikus polipeptidek H/D kicserélődési görbéi, amelyek a peptidhidrogénjeiket adott ρ valószínűséggel engedik felszínre jutni. Ezzel a görbesereggel összehasonlítva a relaxációs spektrumok azt jelzik, hogy az eltemetett peptidhidrogének az oldószer számára hozzáférhetővé tevő konformációs fluktuációk nemkooperatív, átfedő, helyi mozgások, amelyek a fehérje különböző részein különböző valószínűséggel következnek be. A relaxációs spektrum eltolódása az ábra bal alsó sarka felé (azaz nagyobb ρ értékek felé) a konformációs flexibilitás növekedésére utal.



9. ábra: *Tm*GAPDH (négyzet) és *Rm*GAPDH (háromszög) H/D kicserélődésének vizsgálata relaxációs spektrum formájában ábrázolva szobahőmérsékleten. X a kicseréletlen peptidhidrogének aránya, t az idő, és k_0 a kémiai kicserélődési sebességi állandó. A vonalak hipotetikus polipeptidek kicserélődési görbéi, amelyek esetén a peptidcsoportok oldószernek való hozzáférhetőségének valószínűsége állandó. A görbék a termofil enzim kevésbé flexibilis szerkezetét mutatják.

A 9. ábrán mindkét enzim 25 °C-on pH 6 és 7-nél felvett relaxációs spektrumait mutatom be. A szobahőmérsékleten végzett mérés egyértelműen mutatja, hogy a *Tm*GAPDH szerkezete jelentősen rigidebb a nyúl GAPDH-nál, és a peptidhidrogének oldószer általi elérhetőségének eloszlásfüggvénye hasonló. Ez utóbbi arra utal, hogy nem egy kisebb szerkezeti elem jelentős, hanem a teljes szerkezet kisebb fokú rigiditása okozza a mérhető különbséget. Ha a termofil enzim H/D kicserélődését 68 °C-on vizsgáljuk (10. ábra), és ezt hasonlítjuk a nyúl GAPDH szobahőmérsékletű adatával, akkor azt figyelhetjük meg, hogy a konformációs flexibilitás a két enzim esetén hibahatáron belül azonos. (Az összehasonlítás reális, ugyanis a vizsgált hőmérsékletek egyaránt kismértékben az optimális fiziológias hőmérsékletek alatt vannak. Azért nem fiziológias hőmérsékleten mértünk, mert a 68-70 °C-os felső határt a műszer korlátai miatt nem lehetett átlépni.)



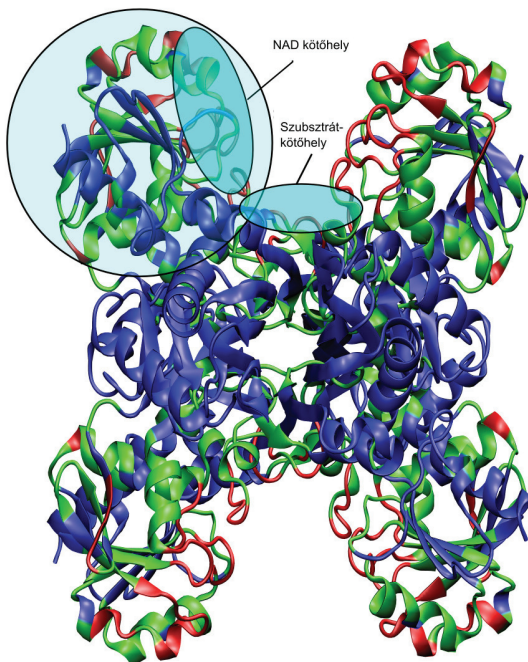
10. ábra: *Tm*GAPDH (négyzet) és *Rm*GAPDH (háromszög) H/D kicserélődésének relaxációs görbe formájában történő ábrázolása az optimális működési hőmérsékletükön (68 illetve 25 °C). A két enzim flexibilitása megegyezik.

Ezekből az eredményekből azt a következtetést lehet leszűrni, hogy a konformációs flexibilitás optimalizálása szükséges az enzimreakció megfelelő katalíziséhez. Az alacsony hőmérsékleten a fehérjemolekula nagymérvű rigiditása rosszabb hatásfokú katalízist tesz lehetővé, amint azt az Arrhenius-ábrázolásból számolható látszólagos aktiválási energia is mutatja.

B-faktor analízis

Az előbbieken tapasztalhattuk, hogy a fehérjemolekula konformációs fluktuációinak hőmérsékletfüggése van, azonban az is érdekesnek tűnt, hogy melyek lehetnek azok a régiók a molekula szerkezetén belül, ahol az eltérő hőmérsékleti viszonyokhoz alkalmazkodott enzimek különböznek egymástól. Erre a kérdésre a két enzim kristályszerkezete adhat magyarázatot. A kristályszerkezetek elemzésénél a B-faktorokat vizsgáltuk meg. A B-faktor, más néven izotróp hőmérsékleti faktor alkalmas a fehérjekristály atomjainak lokális mobilitásának meghatározására (137), azonban csak bizonyos megszorításokkal. A feltételek között fontos, hogy az összehasonlítani kívánt szerkezetek nagyon hasonlóak legyenek, valamint a felbontásuk is közelítse egymást, illetve a kristályosítás körülményei is azonosak legyenek. Esetünkben lehetett találni ilyen szerkezet-párt, amelyek a PDB-ben 1j0x (*Tm*GAPDH) és 1hdg (*Rm*GAPDH) kóddal szerepelnek. A két szerkezet esetén teljesül a nagyfokú hasonlóság ($1,31 \text{ \AA}$ C_{α} rmsd), valamint a felbontás is $2,4$ illetve $2,5 \text{ \AA}$, így lehetőség nyílt a B-faktorok összehasonlítása alapján a flexibilitás-különbségért felelős régiók azonosítására. A módszer során a két szerkezet megfelelő aminosavainak B-faktorainak különbségét vettük figyelembe, és ezek alapján a legnagyobb különbség a NAD kötő doménen fedezhető fel (11. ábra).

NAD kötő domén



11. ábra: A nyúlizom GAPDH tetramer szerkezete (PDB:1j0x). A molekula színezése a C α B faktorok eltérése alapján készült a *Rm*GAPDH és *Tm*GAPDH között. B = B_{*Rm*GAPDH} - B_{*Tm*GAPDH}. Kék: B < 9Å²; zöld: 9Å² < B < 20Å²; piros: B > 20Å². A legnagyobb különbséget mutató régiók (a NAD kötő és szubsztrátkötő régió) vannak kiemelve egy alegységben.

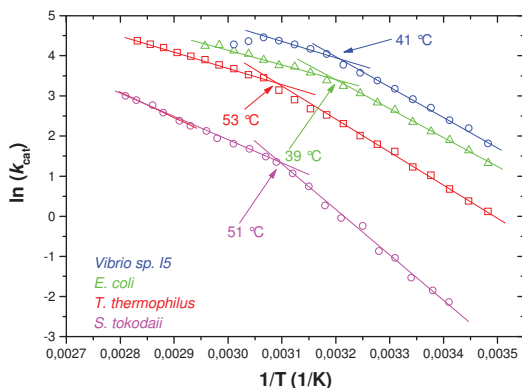
A doménen belül is elsősorban a NAD, illetve a szubsztrátkötő régió mutat nagyobb flexibilitást a nyúlból származó enzim esetén. Ez nem meglepő, mivel az enzim funkciójához pontosan ezeknek a régióknak a flexibilitása szükséges, továbbá azt a korábbi kísérleti eredményt is alátámasztja, hogy az enzim szubsztráttal képzett komplexének flexibilitása alacsonyabb, mint az apoenzimé (138).

Összegezve a tapasztalatokat, kísérleteink alapján kiderítettük, hogy az enzimatis aktivitás és a konformációs flexibilitás között kapcsolat található, azonban az összefüggés mélyebb megértéséhez további kísérletek szükségesek.

Különböző hőmérsékletekhez adaptálódott IPMDH enzimek funkcionális és szerkezeti stabilitásának hőmérsékletfüggésének vizsgálata

Az enzimaktivitás hőmérsékletfüggése

Négy, különböző hőmérsékletre adaptálódott, ortológ IPMDH enzim aktivitásának vizsgáltam a hőmérsékletfüggését azonos méréspont-gyakorisággal (3 °C különbséggel). A vizsgált enzimek az alábbi organizmusokból származnak: *E. coli* (a leginkább elterjedt mezofil baktérium), *Vibrio sp. I5* (hideg tengerekben élő, hidegtűrő organizmus), *Thermus thermophilus* (hőforrásból származó termofil eubaktérium) valamint *Sulfolobus tokodaii* (vulkanikus hőforrásból származó termoacidofil archea). Az IPMDH enzimaktivitása hőmérsékletfüggésének vizsgálatakor a korábbi mérések alapján optimálisnak tekinthető pH-n és sókoncentrációnál dolgoztam (128). Az optimális pH konstans értéken tartása végett foszfátpuffert használtam, amely puffer pK-jának hőmérsékletfüggése igen csekély, ($dpK_a/dT=0,0028$). A méréseket 4 koenzim- és 4 szubsztrátkoncentrációnál, azaz hőmérsékletenként 16 pontban mértem, a kezdeti sebességekből nemlineáris illesztéssel állapítottam meg a k_{cat} és K_M paramétereket. A sebességi állandók hőmérsékletfüggését Arrhenius szerinti ábrázolásban mutatom be (12. ábra).



12. ábra: A négy különböző környezetben élő organizmusból származó IPMDH sebességi állandójának hőmérsékletfüggése Arrhenius-ábrázolás formájában

Jól megfigyelhető, hogy mind a négy enzim aktivitásának Arrhenius-ábrázolása eltérést mutat a lineáristól. A mérési eredmények alapján nem lehet egyértelműen eldönteni, hogy a törés vagy a görbület a valós leírási módja a megfigyeléseknek. Az aktiválási energia értékek csak akkor értelmezhetőek, ha két lineáris szegmens együtteseként értelmezzük az Arrhenius-ábrázolást.

Három enzim (*Vi*IPMDH, *Tr*IPMDH, *Ec*IPMDH) aktiválásienergia-értékei közel azonosak, míg a *Sr*IPMDH aktiválási energia 50%-kal magasabb (2. táblázat). A törésekhez tartozó hőmérsékletadatok különbözőek, amelyek az enzimek hőmérsékleti adaptációjával összefüggésbe hozhatóak.

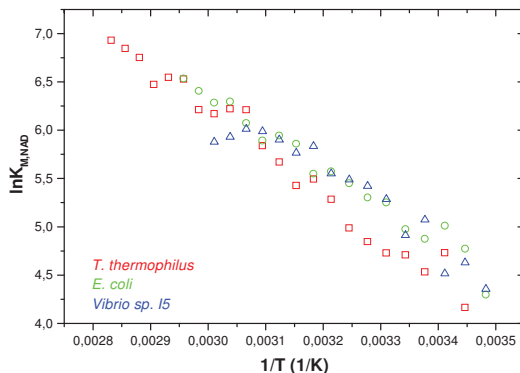
IPMDH	Arrhenius ábrázolás töréspontja	E_{akt} (kJ/mol) alacsony T	E_{akt} (kJ/mol) magas T
<i>Sulfolobus tokodaii</i>	51°C	90,3	47,6
<i>Thermus thermophilus</i>	53°C	64,2	32,2
<i>Escherichia coli</i>	39°C	58,9	31,7
<i>Vibrio sp. 15</i>	41°C	59,7	27,7

2. táblázat: Különböző organizmusokból származó IPMDH-k nemarrheniusi katalízisének jellegzetes hőmérsékletei és az aktiválási energia értékei a „kritikus” hőmérséklet alatt és felett

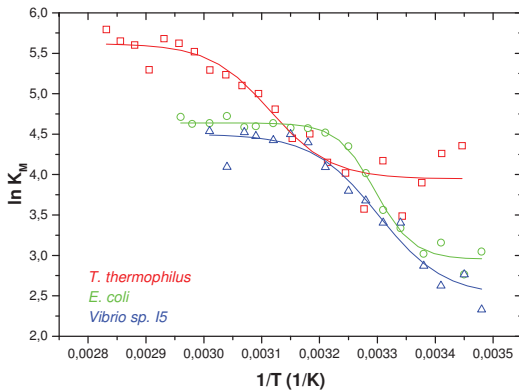
Az Arrhenius-ábrázoláson megfigyelhetőek továbbá az enzimaktivitások egymáshoz viszonyított értékei: szembevetve a *Sr*IPMDH csekély aktivitása a *Tr*IPMDH aktivitásához képest. A *Sr*IPMDH vizsgálata során talált magas aktiválási energia az enzim szerkezetével lehet összefüggésben, ugyanis ennek az IPMDH-nak az oligomerizációfoka a többi IPMDH-étól eltér: nem dimer, hanem tetramer, ahogyan azt a nemrégiben publikált kristályszerkezet is megerősítette (139). Ezzel az enzimmal sajnos további méréseket nem tudtunk végezni, mivel csak limitált mennyiségű fehérjét kaptunk japán együttműködőnktől, de mégis fontosnak tartottam megemlíteni. A *Vi*IPMDH enzim aktivitása minden hőmérsékleten jelentősen meghaladja az *Ec*IPMDH aktivitását is, ami az alacsony hőmérséklethez való alkalmazkodás megnyilvánulása. Az adaptáció lényege az, hogy nem az enzim hőmérsékleti optimuma tolódik el, hanem szélesebb hőmérsékletintervallumban nagyobb az enzimaktivitás a mezofil homológok aktivitásánál, így téve lehetővé az alacsonyabb hőmérséklethez való alkalmazkodást.

A részletesen vizsgált 3 enzim Michaelis-Menten állandóinak hőmérsékletfüggéséről (13. és 14. ábra) megállapítható, hogy a van't Hoff ábrázolás a koenzim esetében lineáris, míg a szubsztrátra vonatkoztatva szigmoid jellegű lefutást mutat. A $NAD K_M$ értéke a hőmérséklet

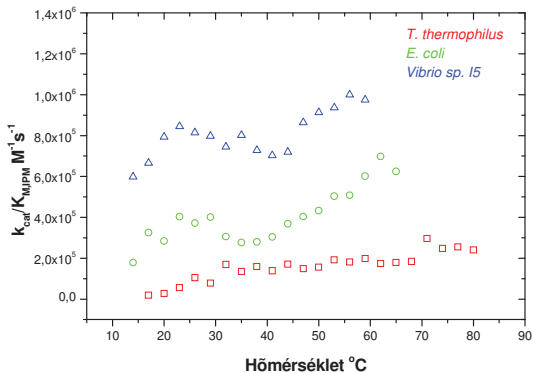
függvényében a van't Hoff ábrázolásban folyamatos lineáris növekedést mutat, ami a NAD kötődésének hőmérsékletfüggő csökkenésére utal (azért csak utal, mert ez nem disszociációs állandó). Az IPM-nél azonban az összefüggés nem lineáris, hanem szigmoidra emlékeztető alakú. Az összetett specifikitási konstans (k_{cat}/K_M) a koenzim esetében folyamatosan nő a hőmérséklet függvényében, a szubsztrát esetében azonban lokális minimum figyelhető meg, a katalitikus hatékonyság így egy szélesebb hőmérsékletintervallumban hozzávetőlegesen konstansnak tekinthető (15.,16. ábra). Figyelembe véve a fiziológiás koncentrációkat, a magas NAD koncentráció miatt a k_{cat} hőmérsékletfüggése fontos, azonban az alacsony IPM koncentráció miatt a $k_{cat}/K_{M,IPM}$ a befolyásoló, tehát a lokális minimum valóban biztosítja az enzimaktivitás hozzávetőleges hőmérsékletfüggetlenségét. Ez a sajátosság a hőmérséklethez való adaptáció egy új, eddig nem megfigyelt módszerére utal, vagyis alacsonyabb hőmérsékleten is megfelelően működik az enzim. Az eredmények mind a három vizsgált enzimmél hasonlóak voltak, így feltételezhető, hogy az enzimkinetikai paraméterek megfigyelt hőmérsékletfüggései az enzimek azonos felépítéséből adódnak.



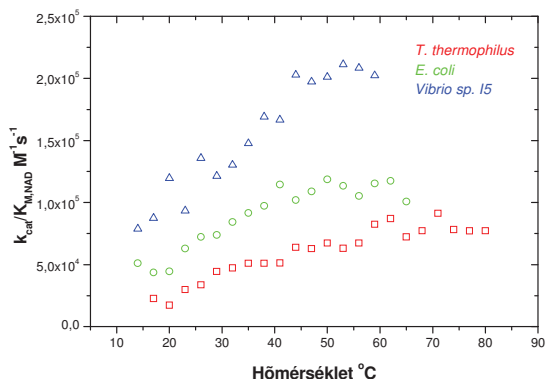
13. ábra: A három IPMDH által katalizált reakcióban a NAD Michaelis-Menten állandójának hőmérsékletfüggése van't Hoff ábrázolásban. A hőmérsékletfüggés lineáris mindhárom esetben.



14. ábra: A három IPMDH által katalizált reakcióban az IPM Michaelis-Menten állandójának hőmérsékletfüggése van't Hoff ábrázolásban. A hőmérsékletfüggés szigmoid lefutást mutat mindhárom esetben.



15. ábra: A három IPMDH által katalizált reakció specificitási konstansának hőmérsékletfüggése ($k_{cat}/K_{M,IPM}$). A Vibrio IPMDH minden hőmérsékleten a legnagyobb aktivitást mutatja, míg a TtIPMDH a legkevésbé aktív. A specificitási konstansok nagyobb hőmérsékleti intervallumon belül sem változnak jelentősen



16. ábra: A három IPMDH által katalizált reakció specificitási konstansának hőmérsékletfüggése ($k_{cat}/K_{M,NAD}$).

A fehérjekonformáció hőmérsékletfüggő változásai

A fehérje konformációjának változásait spektropolarimetriás módszerrel követtem mind a távoli, mind a közeli UV tartományban. Csak a denaturációs hőmérsékleten detektáltam jelentős változást a fehérjék másodlagos, illetve harmadlagos szerkezetében, tehát megállapíthattam, hogy mindhárom enzimre igaz, hogy a tapasztalt hőmérsékletfüggő affinitásváltozások nem kapcsolhatók fehérjekonformáció-változáshoz, legalábbis olyanhoz nem, amit CD spektroszkópiával észlelni lehet. A kalorimetriás eredmények is egyértelműen egy csúcsot adtak, ami megerősíti ezt az eredményt. Az eredményeket a részletesebben vizsgált *E. coli* IPMDH példáján a következő fejezetben mutatom be.

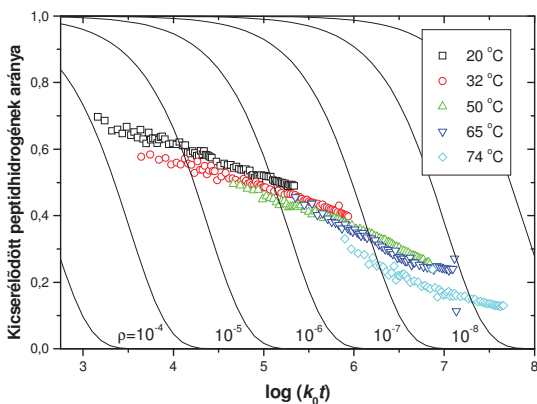
A konformációs flexibilitás hőmérsékletfüggése

A három IPMDH konformációs flexibilitásának hőmérsékletfüggését a műszer és a fehérje tulajdonságai által egyaránt limitált hőmérsékleteken, a 20-77 °C tartományban mértük. A konformációs flexibilitás mérésének módszere a már részletesen bemutatott, FTIR technikával követett H/D kicserélődés volt. A H/D kicserélődés mérések ábrázolására a relaxációs spektrum jól bevált módszer. Kis számú spektrum összehasonlítására tökéletes, de sok görbénél a nagy pontsűrűség miatt gyakorlatilag lehetetlenné válik az ábrázolás (illetve

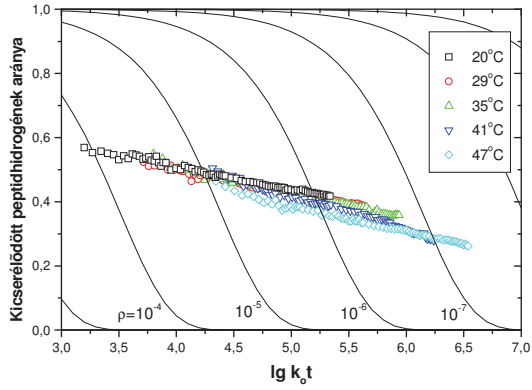
annak értelmezése). Emiatt a különböző hőmérsékletekhez tartozó görbék összehasonlítása érdekében szükségessé vált meghatározni a ΔG_{mic} szabadentalpia-értéket, amely a lokális nemkooperatív legombolyodási lépésekhez tartozó szabadentalpia (134). A szabadentalpia meghatározásához a görbe alatti területet kell kiszámítani a $(0-\infty)$ időtartományra vonatkozóan (140), de mivel mérési adat csak korlátozott időtartományban állt rendelkezésre, így a méréssel nem lefedett tartományban a görbe extrapolációját használtuk. Így már meghatározható volt a szabadentalpia ΔG_{mic} értéke.

A relaxációs görbék seregét és a ΔG_{mic} hőmérsékletfüggését a 17-20. ábrán mutatom be. A grafikonokon feltüntetett t az időt jelöli, míg k_0 a kicserélődés sebességi állandója, ami pD- és hőmérsékletfüggő. (A mérések azonos pD-n készültek, pD=8,15)

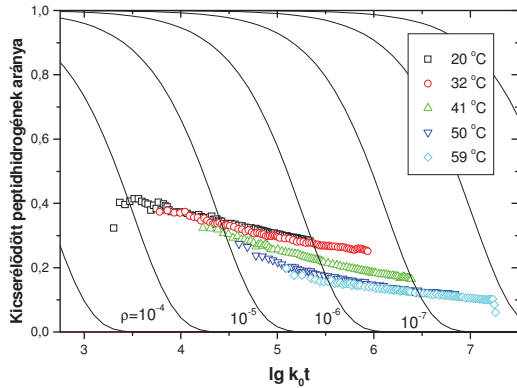
A görbék lefutása a hőmérséklettől függetlenül azonos (a kezdeti szakaszban található eltérés a rendszer termosztálása miatt következik be, a konstans hőmérséklet csak egy rövid transziens szakasz után biztosított).



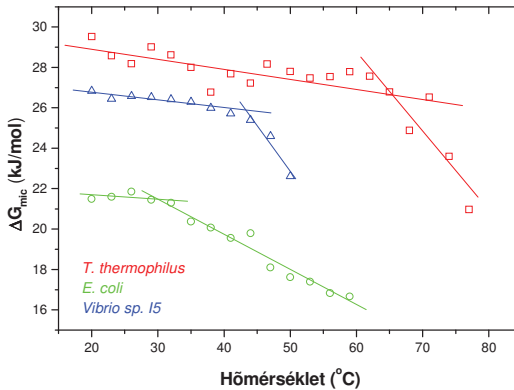
17. ábra: A *Thermus thermophilus* IPMDH különböző hőmérsékleteken mért H/D kicserélődési profilja relaxációs spektrum formájában ábrázolva. A szerkezet flexibilitása magasabb hőmérsékleten nagyobb, a hőmérsékletfüggést ez az ábra nem mutatja be pontosan.



18. ábra: A *Vibrio* sp. I5 IPMDH különböző hőmérsékleteken mért H/D kicszerélődési profilja relaxációs spektrum formájában ábrázolva. A szerkezet flexibilitása magasabb hőmérsékleten nagyobb, a hőmérsékletfüggést ez az ábra nem mutatja be pontosan.



19. ábra: Az *E. coli* IPMDH különböző hőmérsékleteken mért H/D kicszerélődési profilja relaxációs spektrum formájában ábrázolva.



20. ábra: A három IPMDH enzim konformációs flexibilitásának hőmérsékletfüggése. Mindhárom enzim esetén egy gyengébb és egy erősebb hőmérsékletfüggésű tartományt lehet elkülöníteni.

A bemutatott H/D kicserélődés mérések eredménye röviden a következőkben összegezhető: a ΔG_{mic} értékek alapján (20. ábra) következtetésként azt lehet levonni, hogy egy - az adott enzimre jellemző, „kritikus” hőmérsékletig - az enzim globális flexibilitása szinte nem változik, majd ezután a hőmérséklet emelkedésével folyamatos „fellazulás” tapasztalható, ami új konformációs fluktuációk megjelenésére utal. Az új mozgásoknak a háttérét ezek a mérések nem tisztázzák, lehetséges nagyobb mérvű fehérjén belüli elmozdulás, illetve kisebb kiterjedésű átrendeződés is a háttérben, vagy akár csak apróbb, nemkooperatív fluktuációk hőaktivált megjelenése is.

A három enzim a mérések szerint nagyon hasonló „stratégiát” követ, aktivitásuk hőmérsékletfüggése minden bizonnyal ugyanazon fizikai okok miatt változik, a legjellemzőbb különbség a „kritikus” hőmérsékletek eltérése, amelyek az organizmusok hőmérsékleti optimumával mutatnak korrelációt. A három enzimre jellemző hőmérsékleti adatokat a 3. táblázatban tüntettem fel.

Élőlény	<i>Thermus thermophilus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Vibrio sp. 15</i>
Optimális növekedési hőmérséklet	~75	~37	~20
Növekedési hőmérséklet tartománya	55 – 80	10 – 45	–1,5 – 30
Az IPMDH denaturációs hőmérséklete	88	68	63
Az IPMDH-k optimális működési hőmérséklete	66 – 84	48 – 65	46- 59
Az Arrhenius-ábrázolás töréspontja	53	39	41
Változás a szubsztrátkötésben	48	30	28
A flexibilitás- ábrázolás töréspontja	63	32	41

3. táblázat: A vizsgált három organizmus és IPMDH enzimeik jellemző hőmérsékleti adatai (°C).

Szubsztrátindukált szerkezeti változások jellemzése (CD, DSC, H/D)

A ligandumoknak az IPMDH enzimek szerkezetére gyakorolt hatását első közelítésben legjobban kalorimetriával lehet vizsgálni, a telítési mennyiségű ligandum hatására az enzimek hőstabilitása megnő, az apoenzimet különböző mértékben stabilizálják ligandumai. A hőstabilitást az olvadáspontok mérésével jellemeztem. Az elvégzett kísérletek eredményeit a 4. táblázatban gyűjtöttem össze.

	<i>E. coli</i>		<i>Thermus thermophilus</i>		<i>Vibrio sp. 15</i>	
	T _m	ΔT _½	T _m	ΔT _½	T _m	ΔT _½
IPMDH	68,4	4,8	87,6	5,9	63,5	5,8
IPMDH+NAD	68,8	4,1	88,3	4,6	65,1	4,9
IPMDH+NADH	69,1	4,6	87,9	5,0	65,0	5,1
IPMDH+IPM	72,1	3,4	90,9	4,3	69,4	4,0
IPMDH+NADH+IPM	72,5	3,0	92,0	3,2	70,0	3,4

4. táblázat: A különböző ligandumállapotú IPMDH komplexek kalorimetriával meghatározott olvadási hőmérséklete (°C) és a változást kísérő csúcs félértékszélessége (°C)

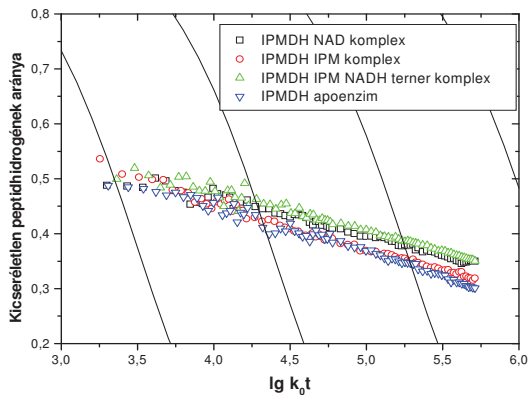
A kalorimetriás mérések során a szubsztrát és koenzim hődenaturációra gyakorolt hatását vizsgáltam, abból a feltételezésből kiindulva, hogy ezek a ligandumok stabilizálják a fehérje szerkezetét, és így a denaturációs hőmérsékletüket megnövelik. A kísérletek során alapfeltételnek tekintettem, hogy telítési koncentrációt használjak a ligandumokból, vagyis a rendszer a lehetőségekhez mérten homogén legyen az adott, vizsgálni kívánt speciést tekintve. A hődenaturációs átmenet minden esetben irreverzibilisnek bizonyult, és korábbi tapasztalatokat felhasználva is reménytelennek tűnt reverzibilis körülmény létrehozása. Az eredményeket így termodinamikai paraméterek számítására kevésbé lehet felhasználni, azonban az olvadáspontnak, illetve a denaturációs átmenethez tartozó félértékszélességnek is hasznos fizikai jelentése van. A kisebb félértékszélesség az átmenet kooperativitásának nagyobb mértékét mutatja, amiből egy adott állapothoz tartozó alállapotok eloszlására lehet következtetni.

Az eredményekből szembetűnő, hogy a NAD és a NADH gyakorlatilag nem változtatja meg egyik enzim átmeneti hőmérsékletét sem szignifikánsan, azonban az IPM-nek jelentős hatása van. A (nemproduktív) terner komplexnél ($\text{IPMDH} + \text{NADH} + \text{IPM}$) az IPM-mel képzett biner állapothoz képest is stabilizálódás figyelhető meg. A IPM szubsztrát stabilizáló hatása összefüggésbe hozható azokkal a krisztallográfiai megfigyelésekkel, hogy az IPM kötődése a rendszer zárt állapotát stabilizálja. Eredményeim azonban azt a feltételezést nem támasztják alá, hogy a NAD-kötődés hatására is létrejönne egy legalábbis félig zárt konformáció. Az IPMDH-IPM biner és a nemproduktív terner komplex denaturációs hőmérsékletének összehasonlítása alapján valószínűleg a biner komplex is zárt állapotban van, azonban ez kevésbé kompakt, mint a terner komplex.

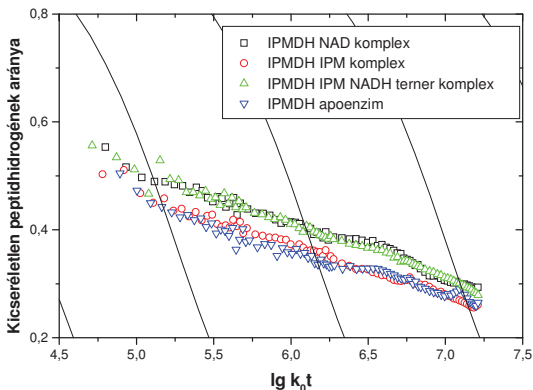
A félértékszélességeket tekintve az apoenzim esetén kaptam a legnagyobb értéket, amit a NADH kötődése szinte egyáltalán nem, a NAD kötődése pedig kismértékben csökkentett. Az IPMDH-IPM már jelentősen kisebb félértékszélességgel denaturálódott, és a terner komplex esetén volt a legkisebb az érték. Az eredmények értelmezésénél azt kell figyelembe venni, hogy az enzimefehérje valamely makroállapota nem egy pontosan definiált térszerkezetet jelent, hanem konformációk sokaságát, amelyek egy mikroszkopikus eloszlást mutatnak, s ezeknek az állapotoknak a termodinamikai stabilitása sem azonos. Amennyiben statisztikus termodinamikai szempontból vizsgáljuk meg az eredményeket, a nagy félértékszélesség a konformációs alállapotok nagyobb termodinamikai stabilitás-különbségeinek következménye, tehát a rendszer nagyobb inhomogenitást mutat, ami egyúttal arra utal, hogy a konformációs tér nagyobb részére terjednek ki a fluktuációk. A kapott eredmények e megfontolások alapján értelmezve tehát arra utalnak, hogy a NAD és NADH kötődése a konformációs

szabadságfokok mentén történő fluktuációkat kevésbé befolyásolja, ezzel szemben míg az IPM-kötés hatására létrejövő változás nemcsak a nyitott-zárt egyensúly eltolódása a zárt állapot irányába, hanem egyúttal a szabadsági fokok mentén történő fluktuációk korlátozása, vagyis a rendszer limitált „befagyasztása” a megfelelő állapotba.

Jól látható, hogy mindhárom esetben az IPM kötődése jelenti a jelentős szerkezetstabilizáló hatást, valamint az enzimekre a ligandumok a hőstabilitás fordított sorrendjében fejtenek ki stabilizáló hatást. Ezt az eredményt megerősíti a 3 IPMDH enzim GuHCl hatására végbemenő denaturációját vizsgálata (141). Az IPM jelenlétében és hiányában végzett mérések azt mutatták, hogy az IPM-nek a legombolyodás sebességi állandójára a *Tt*IPMDH esetén semmilyen, az *Ec*IPMDH esetén közepes, míg *Vi*IPMDH esetén igen jelentős hatása volt; a ligandum jelenlétében mindhárom esetben a sebességi állandó csökkenése volt megfigyelhető. A különböző ligandumállapotú fehérjéket a H/D kicserélődés módszerével is megvizsgáltam, ami a fehérje flexibilitásáról – más fizikai megközelítéssel – szolgáltat információt. Ezeket a kísérleteket öt hőmérsékleten végeztem el, az *Ec*IPMDH esetén a 25-45 °C, a *Tt*IPMDH esetén pedig a 25-65 °C tartományban, 5, illetve 10 °C-os lépésként. A hőmérsékletfüggéssel itt nem foglalkozom, csak egy-egy kiválasztott hőmérsékleten végzett mérési sorozat adatait hasonlítom össze, amely hőmérsékletek a később bemutatott „kritikus” hőmérsékleti értékeknek felelnek meg (30 és 55 °C). A kísérleti eredményeket relaxációs spektrum formájában a 21. és 22. ábrán mutatom be.



21. ábra: *E. coli* IPMDH különböző ligandumállapotú komplexeinek H/D kicserélődéses vizsgálatának eredményei relaxációs spektrum formájában 30°C-on. Az apoenzim és a IPMDH-IPM komplex egymáshoz hasonlóan flexibilis, míg az IPMDH-NAD és IPMDH-IPM-NADH komplexek rigidebb szerkezet mutatnak.



22. ábra: *Thermus thermophilus* IPMDH különböző ligandumállapotú komplexjeinek H/D kicserélődéses vizsgálatának eredménye relaxációs spektrum formájában 55°C-on. Az eredmények szerint az enzim különböző komplexjeinek flexibilitása *E. coli* IPMDH-nál látottakhoz hasonlóan alakul

Az eredményekből jól látszik, hogy a mérési hőmérsékleten a két enzim flexibilitása hasonló módon változik a szubsztrátok hozzáadásának hatására. A NAD-kötés hatására jelentős flexibilitáscsökkenést tapasztaltunk, míg az IPM-kötés hatása elhanyagolható, mind az apoenzimhez, mind a NAD-IPMDH komplexhez viszonyítva. Az eredmények úgy értelmezhetőek, hogy az IPM hatására a globális flexibilitás nem változik – annak ellenére sem, hogy részlegesen záródik a komplex, míg a NAD határozottan növeli a fehérje rigiditását, ennek szerkezeti oka lehet a nagy méretű molekula stabilizáló hatása.

Ezek a kísérletek rámutatnak arra a tényre, hogy bár a szubsztrát és a koenzim hatására is bekövetkezik az IPMDH molekulán kismértékű konformációs változás, de a változás oka és megjelenési formája különbözik. Ezek az eredmények cáfolják azt a (némiel pongyola) észrevételt, hogy az IPM és NAD egyaránt egy részben zárt konformáció felvételét indukálja, és a zárt állapot egyértelműen mindkettőjük jelenlétében alakul ki. Ehelyett egy dinamikus modellel jóval inkább helyesen leírható a rendszer működése.

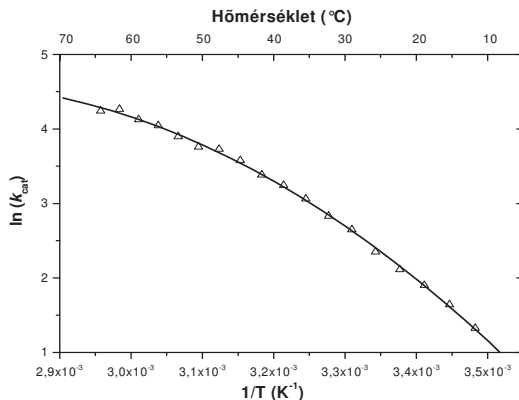
A kísérletsorozat konklúziójaként elmondható, hogy az enzimaktivitás és a konformációs flexibilitás között nemcsak összefüggés van, de a hőmérsékletfüggésük is hasonló, ez arra utal, hogy a mérhető flexibilitást kialakító konformációs mozgások az aktivitáshoz szükséges konformációs mozgásokkal legalább részben csatoltak, vagy megegyeznek vele.

Az *E. coli* IPMDH kinetikai tulajdonságainak rendhagyó hőmérsékletfüggése

A három IPMDH összehasonlító vizsgálata során az enzimaktivitás és konformációs flexibilitás hőmérsékletfüggésének összefüggését vizsgálva a két jelenség között összefüggést találtam, az alaposabb vizsgálatokhoz az *E. coli* IPMDH enzimmel további kísérleteket is terveztem, ezek előtt a korábban már röviden bemutatott eredményeket részletesebben ismertetem.

Az enzimaktivitás hőmérsékletfüggése

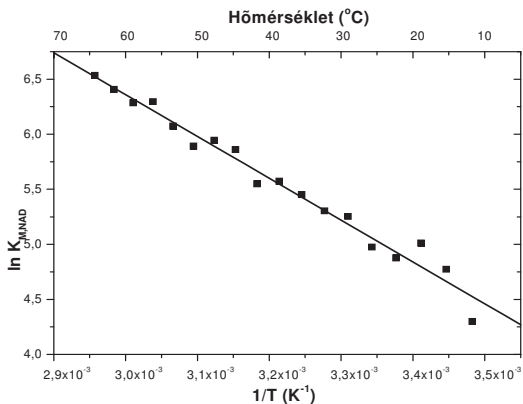
A korábban már közös ábrán bemutatott mérési eredményeket az *E. coli* IPMDH esetében önmagában, részletesen ismertetem. Az enzimkinetikai paramétereket Arrhenius- illetve van't Hoff-ábrázolásban mutatom be (23-27. ábra)



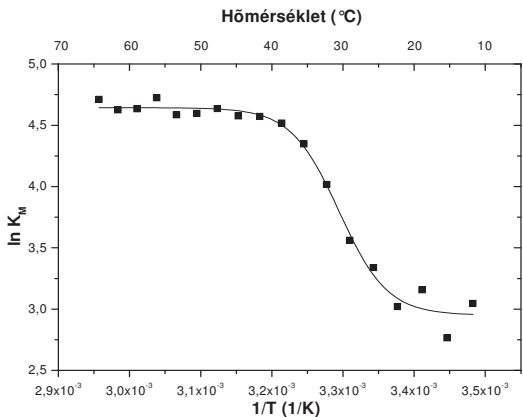
23. ábra: Az *E. coli* IPMDH által katalizált reakció hőmérsékletfüggése Arrhenius szerint ábrázolva. A tapasztalt görbület a komplex kémiai reakció egyedi sebességi állandóinak különböző hőmérsékletfüggésének eredménye lehet

Az Arrhenius-ábrázolás jól láthatóan nem lineáris, legjobban egy görbülettel írható le, amiből leginkább arra lehet következtetni, hogy a k_{cat} összetett reakciósebességi állandó komponenseinek eltérő hőmérsékletfüggése van. A nemlineáris Arrhenius-ábrázolások esetén vitatható, hogy a görbület vagy a törés a rendszer legjobb leírása (87), de szolubilis enzimek

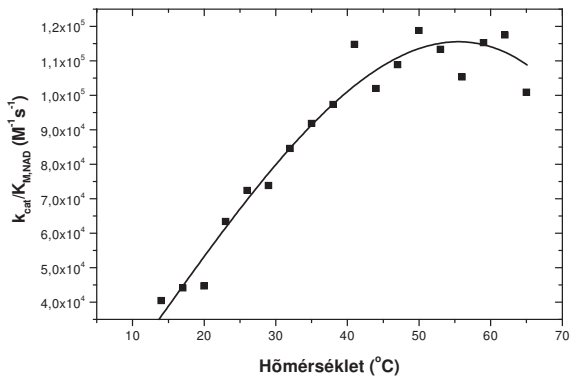
esetén a görbület általánosabban értelmezhető. A van't Hoff ábrázolásokat külön-külön érdemes a szubsztrát és a koenzim esetét tárgyalni.



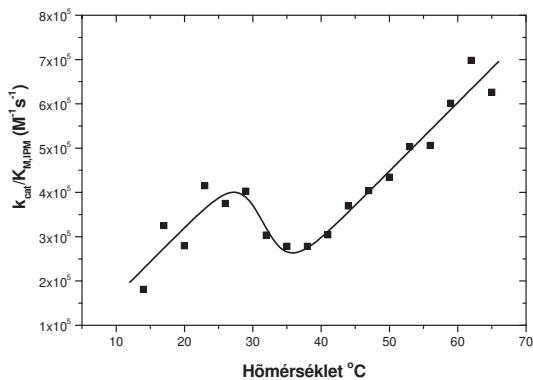
24. ábra: Az *E. coli* IPMDH által katalizált reakcióban a NAD Michaelis-Menten állandójának hőmérsékletfüggése van't Hoff ábrázolásban. A hőmérsékletfüggés lineáris.



25. ábra: Az *E. coli* IPMDH által katalizált reakcióban az IPM Michaelis-Menten állandójának hőmérsékletfüggése van't Hoff ábrázolásban. A hőmérsékletfüggés szigmoid lefutást mutat, a 20-40 $^{\circ}\text{C}$ hőmérsékletintervallumban a $K_{M,\text{IPM}}$ értéke ötszörösére nő.



26. ábra: Az *E. coli* IPMDH által katalizált reakció specificitási konstansának hőmérsékletfüggése ($k_{cat}/K_{M,IPMD}$). Az enzimaktivitás a hőmérséklet növelésével egyenletesen emelkedik



27. ábra: Az *E. coli* IPMDH által katalizált reakció specificitási konstansának hőmérsékletfüggése ($k_{cat}/K_{M,IPMD}$). Az enzimaktivitás szélesebb hőmérsékletintervallumban is csak kis változást mutat.

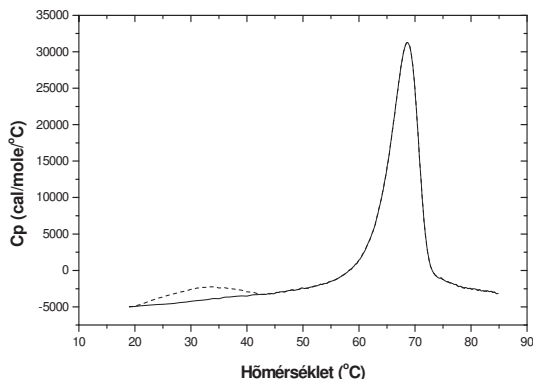
A már korábban leírtakra visszautalva, elmondható, hogy a $\text{NAD } K_M$ értéke a hőmérséklet függvényében a van't Hoff ábrázolásban folyamatos lineáris növekedést mutat, míg az IPM-nél az összefüggés nem lineáris, hanem szigmoidra emlékeztető alakú. Az alacsony hőmérséklettartományban gyakorlatilag konstans $20 \mu\text{M}$, magas hőmérséklettartományban $100 \mu\text{M}$ a K_M értéke, s a két szélső érték között szűk, $\sim 10^\circ\text{C}$ szélességű tartományban következik be az átmenet. A felvázolt alkalmazkodási stratégia lehetősége, vagyis a katalitikus hatékonyság szélesebb hőmérsékletintervallumban hozzávetőlegesen konstansnak tekinthető volta, az *E. coli*-ról felhalmozott tudásanyag ismeretében is megállja helyét. Az *E. coli* jól ismert organizmus, így ismert (142), hogy milyen hőmérséklet határok között, és hogyan képes növekedni. 42°C -nál magasabb hőmérsékletet nagyon rövid ideig visel el, azonban még akár 20°C -on is „elfogadhatóan” tud élni és szaporodni (az „elfogadható” szó inkább a biotechnológiai alkalmazások szempontjából értendő, mivel heterológ expresszió esetén gyakran arra van szükség, hogy az *E. coli* szuboptimális hőmérsékleten növekedjen, ezáltal a termelt idegen fehérjét jobban tolerálja, azt kevésbé fejezze ki zárványtest formájában). Az alacsonyabb hőmérsékleten való túlélést az IPMDH-nál talált hőmérsékletfüggés elősegítheti.

Mivel az IPMDH a β -dekarboxilező dehidrogenázok családjának nem egyedüli tagja, a talált effektus akár szélesebb körű is lehet (az izocitrát dehidrogenáz a trikarbonsav-ciklusban, a homoizocitrát dehidrogenáz a lizin bioszintézisében vesz részt, míg a borkósav-dehidrogenáznak csak marginális szerepe lehet az általános élettani folyamatokban, mivel alig néhány organizmusból írták le ezt az enzimet). Elképzelhető lenne egy olyan kísérletsorozat, amely során a β -dekarboxilező dehidrogenázok dinamikai sajátosságait összehasonlító vizsgálat során térképezzük fel. Eredményként talán megérthetnénk az allosztéria kialakulását is egy közeli rokonságot mutató enzimes családban.

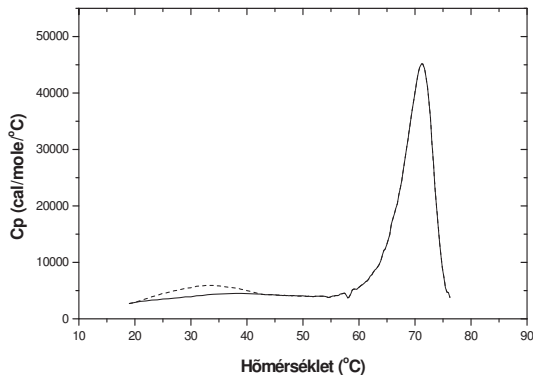
A fehérjekonformáció hőmérsékletfüggő változásai

Az IPM Michaelis-állandójának a van't Hoff ábrázoláson látható, szigmoid jellegű hőmérsékletfüggése (25. ábra) arra enged következtetni, hogy 30°C körül hőmérsékletindukált konformációváltás következhet be. A következőkben ismertetett mérésekkel ezt a lehetséges konformációváltást (vagy annak hiányát) próbáltuk kimutatni. Ha a K_M hőmérsékletfüggő változását két statikus, az IPM felé eltérő affinitással rendelkező konformációs állapot közötti egyensúly hőmérsékletfüggő eltolódásának tulajdonítjuk, akkor ezt az eltolódást a van't Hoff törvény értelmében a két állapot közötti entalpiakülönbség

határozza meg. Az ennek megfelelő entalpiaváltozásnak kalorimetriás módszerrel mérhetőnek kell lennie (143). A 25. ábrán látható szigmoid görbét ennek megfelelően kiértékelve kiszámítható a van't Hoff entalpia, mely 26 kJ/mol-nak adódik, az átmenet középpontját pedig 31°C-nál várjuk. A kalorimetrikus entalpia értéke a van't Hoff entalpia értékénél nem lehet alacsonyabb (144), így elkészíthetjük azt a hipotetikus termogrammot, amely tartalmazza az ehhez az átmenethez tartozó jelet. Az IPM jelenlétében és hiányában felvett kalorimetriás görbéken (28-29. ábra) azonban ilyen csúcsot egyáltalán nem látunk; az egyetlen, nagy csúcs a teljes denaturációhoz tartozik. E mérések tehát egyértelműen kizárják, hogy (kétállapotú modellt feltételezve) hőmérsékletindukált konformációváltozás következék be 31°C környékén, függetlenül a szubsztrát jelenlététől.

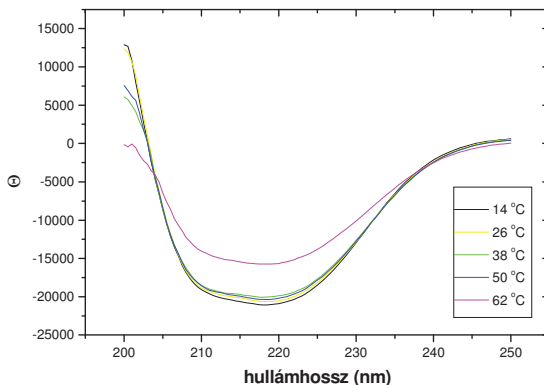


28. ábra: *E. coli* IPMDH valódi és hipotetikus (szaggatott vonal) kalorimetriás görbéje, IPM hiányában

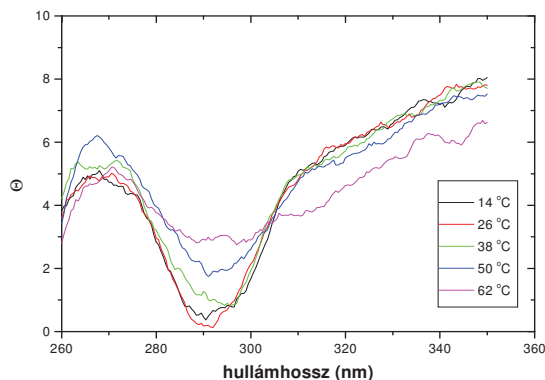


29. ábra: *E. coli* IPMDH valódi és hipotetikus (szaggatott vonal) kalorimetriás görbéje, IPM jelenlétében

Az esetleges konformációváltozást CD-spektroszkópiás mérésekkel is megpróbáltam detektálni. Ehhez a közeli és távoli UV-tartományban teljes spektrumokat vettem fel a fehérjéről (30. és 31. ábra). Nem észlelhető semmilyen változás abban a hőmérséklettartományban, ahol a szubsztrát disszociációs állandója és az enzim konformációs flexibilitása is változást mutat. A technika limitációit is figyelembe véve kijelenthető, hogy a másodlagos szerkezeti elemek aránya nem változik, tehát a flexibilitásnövekedés nem az α -hélixek vagy β -redők lokális legombolyodásának következménye, illetve az aromás aminosavak szűk lokális környezete sem szenved jelentős konformációváltozásra utaló módosulást.



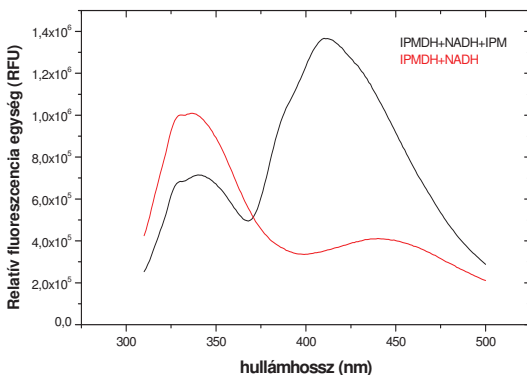
30. ábra: Az *E. coli* IPMDH távoli UV tartományban felvett CD spektruma különböző hőmérsékleteken. A katalitikus aktivitás szempontjából kritikus hőmérsékleten nincs változás, csak a denaturációs hőmérséklet közelében.



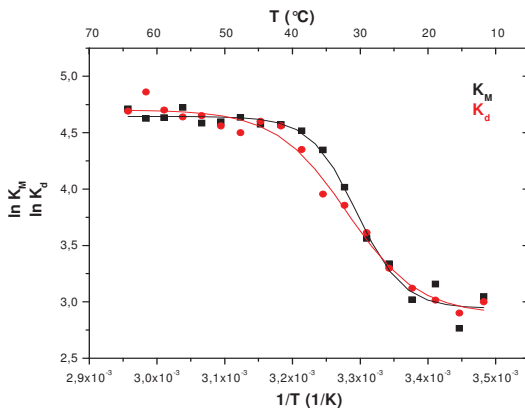
31. ábra: Az *E. coli* IPMDH közeli UV tartományban felvett CD spektruma különböző hőmérsékleteken. A harmadlagos szerkezet a másodlagos szerkezetnél alacsonyabb hőmérsékleten bomlik meg, ám csak jóval a kritikus katalitikus hőmérséklet felett.

A szubsztrát-enzim affinitás hőmérsékletfüggő változása

Az enzimaktivitás hőmérsékletfüggő vizsgálatakor megfigyeltem, hogy a $K_{M,IPM}$ értéke szűk hőmérséklettartományon belül jelentősen megváltozik, azonban, mivel a K_M származtatott mennyiség, szerettem volna látni, hogy az enzim-szubsztrát kölcsönhatásra jellemző disszociációs konstans milyen viszonyban áll ezzel az értékkel. A disszociációs állandót Dean és Dvorak munkája (131) alapján egy FRET alapú méréssel határoztam meg. A mérések szerint a nem-produktív terner komplex fluoreszcenciáját vizsgálva 420 nm-en egy igen jellegzetes FRET jel tapasztalható. A szubsztrát hiányában a FRET jel csak minimális mértékben van jelen, de szubsztrát hozzáadásának hatására a jel telítési görbe szerint változik, és a telítési görbéből meghatározható a disszociációs konstans. A FRET jelet mutató fluoreszcenciaspektrumokat a 32. ábrán mutatom be. A telítési görbe alapján meghatározott disszociációs állandók hőmérsékletfüggését a 33. ábra mutatja. Amint az jól látható, a K_d és K_M értékek kísérleti hibán belül megegyeznek, így bizonyossá vált, hogy a K_M hőmérsékletfüggésében talált meglepő szigmoid változás nem artefaktum, hanem ténylegesen az enzim-szubsztrát affinitás változását jelenti.



32. ábra: Az *E. coli* IPMDH fluoreszcenciaspektruma IPM jelenlétében (fekete) és hiányában (piros) állandó koncentrációjú NADH mellett. Az IPMDH+NADH komplexhez hozzáadott IPM hatására 420 nm-en nagy intenzitású csúcs jelenik meg, ennek kialakulása a terner komplex kialakulásához köthető, ez szolgál a további mérések kiindulópontjaként

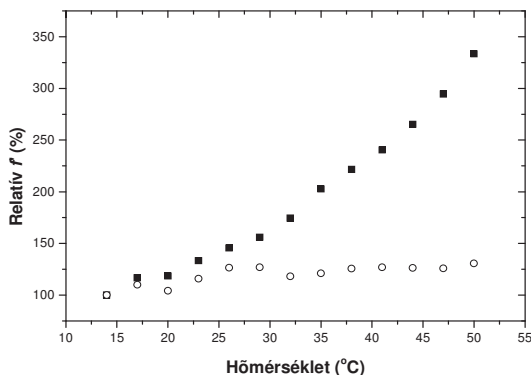


33. ábra: Az *E. coli* IPMDH aktivitásméréséből meghatározott Michaelis-Menten állandó és a FRET mérésekből meghatározott disszociációs állandó (mindkettő IPM-re vonatkoztatva) hőmérsékletfüggése. Az azonos értékek azt mutatják, hogy a K_M érték fizikai megfelel a K_d értéknek.

FRET mérések a hőmérséklet függvényében és azok szerkezeti, illetve dinamikai értelmezése

A FRET-mérések a disszociációs állandónak és hőmérsékletfüggésének meghatározásán kívül további megállapításokra adnak lehetőséget. Megfigyelhető, hogy az IPM jelenléte nagyban befolyásolja a kialakuló jelet, így következtéseket lehet levonni a szubsztrát kötődésének mechanizmusára is. A FRET-hatékonyság meghatározását Stryer (145) alapján gerjesztési spektrumok elemzése útján végeztem el, és ezeket a méréseket a 20-50°C hőmérsékleti tartományban hajtottam végre. A FRET-hatékonyság a szubsztrátmentes állapotban 0,1, míg szubsztráttal telítve 0,4 körüli értéket mutatott, ami arra utal, hogy a szubsztrát kötődése jelentős elmozdulást indukál az energiatranszfer létrehozó donor és akceptor csoportok között. A donzorok szerepét itt a triptofán oldalláncok játsszák, mivel a gerjesztés 295 nm-en történik, így a tirozinok hozzájárulása elválasztható volt. Az energiatranszfer a dimerben előforduló négy triptofán mint donzorok, és a két NADH molekula mint akceptorok részvételével alakul ki. A fehérjemolekulán belüli elrendeződést vázlatosan a 34. ábra mutatja be. Mivel szimmetrikus homodimerrel van dolgunk, ezért egyszerűsítésként csak az egyik NADH molekulát és lehetséges elmozdulásait tárgyalom az ismert IPMDH-szerkezetek elemzése alapján. A nyitott állapotban (PDB:1HEX) az A alegységhez kötődő NADH-tól kb. 11 Å távolságra található a Trp81, míg a Trp205 27Å, a másik alegységben lévő Trp205' pedig 24 Å, ill. a Trp81' 54 Å távolságban van. A zárt állapotban (PDB:1A05, ez a kristályszerkezet nem tartalmazza a NAD-ot, így azt utólag kellett a szerkezetbe beilleszteni) az A alegységhez kötődő NADH-tól kb. 10 Å távolságra található a Trp81, míg a Trp205 28 Å távolságra van, a másik alegységben lévő Trp205' 17 Å távolságra közeledik, a Trp81' pedig 44 Å távolságba kerül. A két állapot közötti jelentős különbség a FRET-hatékonyságban úgy magyarázható, hogy a közeli Trp81 nem vesz részt a kölcsönhatásban, a jelváltozás elsősorban a Trp205' elmozdulásának következménye. A Trp205 hatása mindkét állapotban egyaránt alacsony, a számítható R_0 érték (Förster távolság: az a távolságérték, ahol a FRET-hatékonyság 50%) ez utóbbi triptofán hatását figyelembe véve 16,0 Å, míg azt figyelmen kívül hagyva 16,3 Å. A Trp81' a nagy távolság miatt nem befolyásolja a jelet. Fontos megemlíteni, hogy a Förster-távolság meghatározása során mindegy, hogy a nyitott vagy a zárt állapot távolsági és FRET hatékonysági paramétereit vesszük a számolás alapjának, az eredmény azonos, a kapott R_0 érték összemérhető más kísérletek eredményeivel (146, 147).

értelmezett fehérjedinamika tanulmányozását. Az f^* paramétert a hőmérséklet függvényében vizsgálva (35. ábra), a szubsztráttal telített enzim esetében közel állandó, azonban a szubsztrátmentes állapotban a hőmérséklettel növekszik, kb. 30 °C-tól a növekedés intenzívebbé válik. Ezt a fluorofórok közötti átlagos távolság körüli fluktuációk amplitúdójának növekedésével lehet magyarázni (148), ami a H/D kicserélődés mérés során talált konformációs flexibilitás változásával hasonlóságot mutat. A két mérés különböző fizikai folyamatok vizsgálatára alkalmas, a H/D kicserélődés során a lokális fluktuációk hatása, míg a FRET méréseknél a domén-domén kölcsönhatások nagy kiterjedésű mozgásai figyelhetőek meg.



35. ábra: Az *E. coli* IPMDH f^* paraméterének hőmérsékletfüggése telítési koncentrációjú IPM jelenlétében (üres) illetve IPM hiányában (teli). A szubsztrátmentes állapotban a hőmérséklet növelésével emelkedő jel a fluktuációk növekvő amplitúdójának tulajdonítható.

Az *E. coli* IPMDH enzim működésének dinamikus modellje

Eredményeim alapján az IPMDH enzim működésének dinamikus modellje, amely az enzim konformációjának, illetve flexibilitásának változását írja le a katalízis során, a következő: az enzim oldatban két lehetséges konformációs végállapot között (nyitott és zárt) fluktuál, miközben számos átmeneti állapot is megvalósul. A kötött ligandumok ezt az egyensúlyt befolyásolják, valamint a fehérje konformációs flexibilitását is módosítják. A sejten belüli koncentrációviszonyok alapján az enzim egyensúlyi állapota a NAD⁺ kötött forma, amely egy

rigid, de nyitott konformációjú, IPM kötésére képes állapot. A szubsztrát kötése doménzáródást indukál, így kialakul az aktív állapot, és a katalizált reakció lejártszódik. A reakció lezajlása után a termékek disszociációja következtében kialakuló apo forma flexibilis, nyitott jellegű szerkezet, amely egyaránt képes NAD és IPM kötésére (ezt támasztja alá a kimutatott „random bi-bi” mechanizmus is (131)). A reaktív turner komplex kialakulása végbemehet a nyitott, de rigid IPMDH-NAD, valamint a zárt jellegű és flexibilis IPMDH-IPM komplexen keresztül egyaránt.

A javasolt dinamikus modellben figyelembe vettem a ligandumok sejtbeli koncentrációját. Az IPM és metabolitja, a 2-ketoizokapronsav koncentrációja az IPMDH által katalizált reakció során, valamint az „elágazó láncú aminosav transzamináz” (BCAT) és a 3-izopropilmalát dehidratáz révén változik, koncentrációja végig alacsonynak tekinthető. Ezzel szemben a NAD és a NADH rengeteg folyamatban részt vesz, sejtbeli koncentrációjukat az IPMDH szignifikánsan nem befolyásolja, koncentrációjuk konstansnak tekinthető. Ezek a konstans értékek a következők: NAD esetén 800 μM , NADH esetén pedig 1 μM .

Az *E. coli* IPMDH enzim működési mechanizmusa

Az IPMDH katalitikus hatékonysága (k_{cat}/K_M) szélesebb hőmérséklettartományban sem változik lényegesen, ezt az enzim-szubsztrát (IPMDH-IPM) kölcsönhatás hőmérsékletfüggése okozza. Magasabb hőmérsékleten a szubsztrát affinitása alacsonyabb, ezt a disszociációs állandók értékei bizonyítják. A csökkenő affinitás hátterében két folyamat együttes hatása állhat: a domén-domén mozgások, valamint a lokális fluktuációk hatása. A szubsztrát kötődéséhez az enzim egyik alegysége 1., és másik alegysége 2. doménjének térbeli közelségére van szükség (34.ábra), a szubsztrát kötődése indukált fit mechanizmus szerint megy végbe. A kapott eredmények alapján valószínűsíthető, hogy az enzim affinitása a szubsztráthoz azért csökken magasabb hőmérsékleten, mert a nagyobb amplitúdójú „hinge-bending” fluktuációk megnehezítik az IPM kötődését. Ez tehát a fő okozója a $K_{M,IPM}$ szigmoid jellegű növekedésének a 20-40°C hőmérséklettartományban, s ennek következményében alakul ki az IPMDH katalitikus hatékonyságának rendellenes hőmérsékletfüggése. A H/D kicserélődés mérések alapján a lokális konformációs fluktuációk szintén egyértelmű növekedést mutatnak ebben a hőmérsékleti tartományban, ezeknek szerepe a szubsztrátaffinitás hőmérsékletfüggésében nem azonosított.

Az IPMDH esetében tehát közvetlen összefüggést találtunk a konformációs flexibilitás egy bizonyos típusa – a relatív doménmozgásokhoz tartozó flexibilitás – és az enzimaktivitással

összefüggő egy bizonyos paraméter – a szubsztrát disszociációs állandója – között. Itt azonban az összefüggés az eddigieknél látottakhoz képest fordított irányú: az intenzívebb fluktuációk nehezítik a szubsztrát kötődését, ezzel csökkentve a katalitikus hatékonyságot. A flexibilitás–aktivitás összefüggésnek tehát még az iránya is attól függ, milyen típusú flexibilitást és milyen aktivitási mérőszámot vizsgálunk.

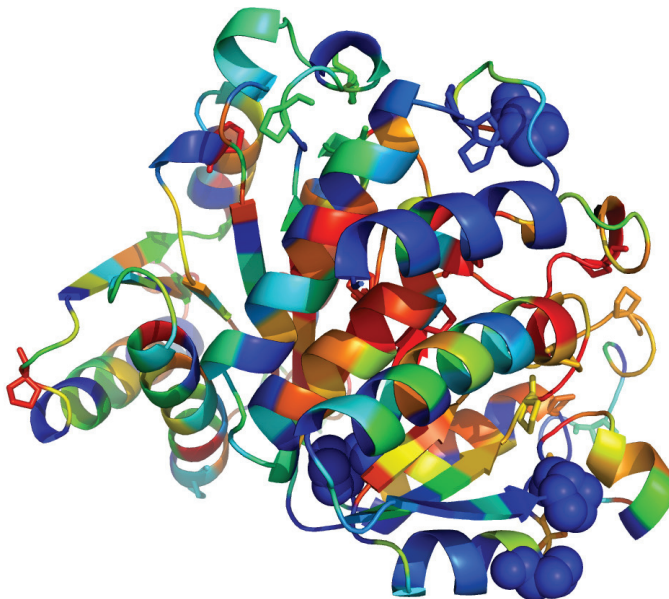
A harmadik mérősorozatban a konformációs flexibilitásnak egyes komponenseit vizsgáltam. A fehérje globális flexibilitást kialakító lokális, egymástól független legombolyodásokat is detektáló H/D kicserélődés módszerével, valamint a kooperatív domén-domén mozgások analizésére alkalmas FRET módszerrel. Méréseim alapján el lehet különíteni a kétféle – általánosan flexibilitásnak nevezett – fluktuáció szerepét az enzimaktivításra gyakorolt hatásában. A kiterjedt domén-domén módusok egyértelműen csatolásban vannak az enzimaktivitással, míg a lokális fluktuációk hatása nem azonosítható.

Irányított flexibilitásnövelő mutációk hatása a TtIPMDH szerkezetére és aktivitására

Doktori munkám negyedik egysége egy irányított mutációs kísérletsorozat volt, melynek célja az IPMDH enzim aktivitása és konformációs flexibilitása közötti direkt összefüggések felderítését célozta meg. Mutagenézis segítségével korábban az IPMDH-t stabilizáló kölcsönhatásokat próbáltak kialakítani (129, 149). Az itt tárgyalt megközelítéssel azt a hipotézist próbáltuk alátámasztani, hogy az enzimaktivitáshoz a konformációs flexibilitás megfelelő beállítása szükséges. A flexibilitás növelését Pro→Gly mutációk sorozatával próbáltuk előidézni, mégpedig többszörös mutációval, mivel kumulált hatásuk vélhetően nagyobb, mint az egyszeres mutációké.

Tervezés összerendezés segítségével

A TtIPMDH szekvenciájában feltűnően sok prolin van, ez adta az ötletet, hogy ezek hozzájárulása az enzim tapasztalható rigiditásához jelentős lehet, és a prolinok glicinekre való cserélése megnövelheti a konformációs flexibilitást, és egyúttal az enzimaktivitást. A munkát a szekvencia- és térszerkezetadatbázisokban fellelhető információk feldolgozásával kezdtk. A Swiss-Prot adatbázisban a munka kezdetén 56 szekvencia, a PDB adatbázisban pedig 5 szerkezet volt elérhető. A szekvenciaösszerendezésben a térszerkezeti adatokat is felhasználtuk a másodlagos szerkezeti elemek összerendezéséhez, így egy „vak” ClustalW összerendezésnél pontosabb képet tudtunk megalkotni. Ezek után a TtIPMDH-ban levő 25 prolint vizsgáltam meg, hogy azok milyen konzerváltságot mutatnak a többi szerkezethez viszonyítva. Kétféle nemkonzervált prolint tudtam elkülöníteni: az egyik esetben a prolin csak a *Thermus thermophilus* és *Thermus aquaticus* organizmus IPMDH enzimében fordul elő a megfelelő helyen, míg a másik esetben a prolin gyakrabban előfordul, de a glicin a preferált aminosav. Az első csoportba a Pro40 és Pro56, a második csoportba a Pro267 és Pro325 tartozott. Az összerendezés alapján a konzerváltságnak megfelelő színezéssel szemléltetem a TtIPMDH konzervált és nemkonzervált régióit (36. ábra), valamint az összerendezés kiemelt részleteit is bemutatom (37. ábra). A konzerváltság mérőszámaként azt az adatot használtam, hogy a TtIPMDH szerkezetében megtalálható adott aminosavnak megfelelő pozícióban az összes IPMDH-szerkezet hány százalékában fordul elő ugyanazon aminosav.



36. ábra: A *Thermus thermophilus* IPMDH térszerkezete (PDB:1HEX). Az ábrán a színezés az adott aminosavak konzerváltsága alapján készült. A piros szín a leginkább konzervált, a kék a legkevésbé konzervált aminosavakat jelöli. A négy, térkitöltő modellben megjelenített aminosav a mutációs kísérletek alanyául választott négy prolin (Pro40, Pro56, Pro267, Pro325).

Ezek alapján elkészítettük az összes egyszeres mutációt, a kettős mutációk közül az azonos csoportba tartozó párokat tartalmazókat, illetve két háromszoros, valamint a négyszeres mutációt. A szekvencia-összerendezésből látszik, hogy a Pro40 pozíciójában Leu, a Pro56 pozíciójában pedig Glu az általában preferált aminosav, ezért kontrollként a P40L és P56E mutációkat is elkészítettem. A mutánsokat (11 db) az *Anyagok és módszerek* részben leírt módon készítettem el és tisztítottam, a továbbiakban a jellemzésükről lesz szó, elnevezésüket az 5. táblázatban mutatom be.

Mutáns jelölése	1N	1K	2N	2K	3N	3K	4N
	P267G	P40G	P267G,P325G	P40G,P56G	P40G,P267G,P325G	P40G,P56G,P267G	P40G,P56G,P267G,P325G

5. táblázat: Az elkészített, később kóddal említett mutációk jelölései

Először CD spektroszkópiával a mutáns fehérjék másodlagos szerkezetét vizsgáltam, az minden esetben nagyon jól megfelelt a vad típusnak, ezért a további vizsgálatokra alkalmasnak nyilvánítottam őket.

LEU3	CANBO	IQKFENHLLIGGAAIDATGVPLFDEALEAAKKSDAVLLG----	AV
LEU3	PICAN	KFNFSKHLIGGASIDAYGVPLSDEALEAAKKDAVLLG----	AV
LEU3	PICST	HFEPKHHLLIGGAIDSTGVPLFDDSLAAAKLSDAVLLG----	AV
LEU3	YAMOH	KFEFKHHLLIGGAIDATGVPLFDETLAAKSSDAVLLG----	AV
LEU3	CANMA	HFDKHHLLIGGAIDATGVPLFDDALESAKNSDAVLLG----	AV
LEU3	CANAL	QDFDKHHLLIGGAIDATGVPLFDDALESAKSSDAVLLG----	AV
LEU3	ASHGO	HFDQYHLVGGAAIDATGSALEFDEALGAAKEADAVLLG----	AV
LEU3	YARLI	EFVFEEDRLIGGAIEKEGEPITDATLIDICRKADSIMLG----	AV
LEU3	ASPNG	TINLQDHLIGGASIDATANPLTDEALAAAKNDAVLLG----	AI
LEU3	MYCGR	HFNLQPHLLIGGASIDAHGEPLTDEALAAAKAADAIVLLG----	AI
LEU3	NEUCR	KFNLQNHLLIGGASIDKHNDPLTDEALNAAKAADAIVLLG----	AI
LEU3	SCHPO	KLEFEEHKIGGASIDAYGTPLTDETVKACLEADGVLLG----	AV
LEU3	PHACH	EIKLETHDFGGCSIDKHGEPLTAATLEACKLADAILLG----	AI
LEU3	ASPNG	QFHLQEEELIGGISIDTHGHSVTQPVKDAAVAADAVLFA----	AV
LEU3	CEPAC	HFNLTTDLVGGTSDITHGVPIQTQSVLDAAKASDAVLLG----	SI
LEU3	LACLA	EYEFYAKDFGGIAIDKHGHPLFEETLQAVKNADAIVLLG----	AI
LEU3	BACFR	KVNYEYAIAGDAIDKVGDFPEEETRYRCKNADAVLFS----	AV
LEU3	AQUAE	EFEYREGLLGGBAIDKTCGDLPEEETLKICKESDAILLG----	AV
LEU3	CLOPA	KFNFEVVKAGGDAIDAYGEPLPKETIDVCKSSAAVLLG----	AV
LEU3	ECOLI	RITTSHYDVGGAAIDNHGQPLPPATVEGCEQADAVLFG----	SV
LEU3	SALTY	RITTSHYDVGGIAIDNHGHPLPKATVEGCEQADAVLFG----	SV
LEU3	HABIN	KLNFNFFVGGAAIEHCGYPLFAETLKGCDQADAILFG----	SV
LEU3	BUCRP	EYELREFSVGGIAIDRBGIALFEETLRGCENSDAILFG----	SV
LEU3	BUCAI	SLEIQKFNLGGIAIEREGVALEKTTLLGCENSDSILLG----	SV
LEU3	LEPIN	EFQFKEGFGVGGIAIDKTHGHPPLPPEETLKLCESSAILFG----	SV
LEU3	THEMA	TFEKFVFGHIGGDAIDRFGEPLPEETKKICLEADAIFLG----	SV
LEU3	AZOV1	GFVLGYDDELGGAAVDKYGVPLADETLERARRR-CHPAR----	RR
LEU3	PSEAE	GFELAEDVIGGAAIDKHGVPLADQTLQARQADAVLLG----	AV
LEU3	NEILA	DAGYEVAPLGGEAYDEYGHYEFETQNLCKKADAVLLG----	AV
LEU3	THIFE	GLRCTEGLVGGAAALDASDDPLFAASLQLAMAADAVILG----	AV
LEU3	AGRTU	GFVTSGLVGGSAIDAHGVAISDADMEKALAADAILFG----	AV
LEU3	SYNY3	AFNFQEBALIGGAAIDATGQPLPEATLQAQKDSDAVLLA----	AI
LEU3	SIPLI	NFEFKBALMGGAIDATGEPLPEESLQACRDSDAVLLA----	AI
LEU3	BRANA	EFSFQEMPVGGAAIDLVGVPLFEETVSAAKESDAVLLG----	AI
LEU3	BACSU	EFEFEYGLIGGAAIDHHNPLFEETVAAACKNADAILLG----	AV
LEU3	BACME	QFEFTYGLIGGAAIDAEAGSSSSRSTIETCNEADAVLLG----	SV
LEU3	BACCA	EFTFEYGLIGGAAIDAEAGTPLFEETVRLCRSDAVLLG----	AV
LEU3	BACCO	EAVFENALIGGAAIDAEAGTPLFEETLIDICRRSDAILLG----	AV
LEU3	THETH	GLAYEVFPFGGAADAFGEFPFEETPRKGVVEEAAVLLG----	SV
LEU3	THEAQ	GLTYETFPFGGAADIGYGEFPFEETVRKGVVEEAAVLLG----	SV
LEU3	METTH	DLEPTHADAGDACLKRTGTALFEETLEAVGEARATLFG----	AA
LEU3	ARCFU	PFEYSYDAGDEALEKYKALFDETLACRKSDAVLFG----	AA
LEU3	METJA	PFEFVYABAGDEVYKRTGKALFEETIETALDCDAVLFG----	AA
LEU3	SOLTU	PIEWEEHYVGTEDPRTNSFLTWESELESVRNRNKGKGMATPI	
LEU3	SULTO	PIEYIEVABAGDRALARYGEALFKDSLKIIDKADIIILKG----	PV
LEU3	MYCBO	GVQKTSYDLGARRFHATGEVLFDSVVAELRNHDAIILG----	AI
LEU3	MYCTU	GVQKTSYDLGARRFHATGEVLFDSVVAELRNHDAIILG----	AI
LEU3	MYCLE	GVQKTTYDLGARRYHTTGELLPESVLAELREHDAIILG----	AV
LEU3	CORGL	DIETTDYDLGARRYLNKGELLTDEDLASREHDAIILG----	AI

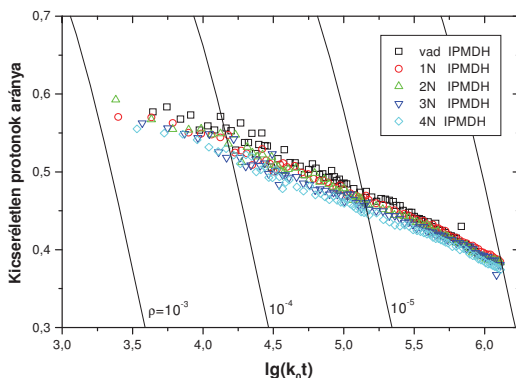
↑ Pro40

↑ Pro56

37. ábra: Az IPMDH szekvenciák összerendezésének részlete. Az ábrán jól látszik, hogy a Pro40 és Pro56 csak kevés szekvenciában fordul elő, míg például a Pro54 igen konzervált aminosav. Az összerendezések további részleteit nem mutatom be, de ez a kis részlet is jól mutatja a lényegét, azaz hogy a *Tli*IPMDH több nemkonzervált prolint tartalmaz, mint az ortológjai.

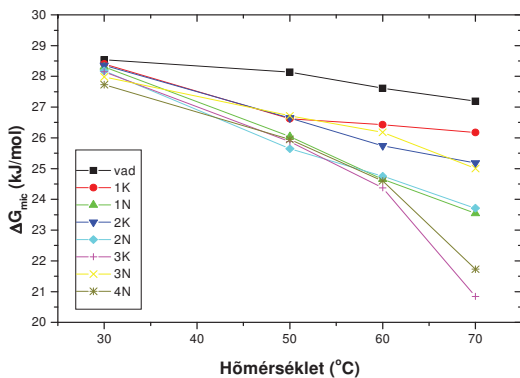
A mutáns enzimek konformációs flexibilitásának jellemzése

Mivel a tervezett mutációk elsődleges hatásaként a konformációs flexibilitás növekedését vártuk, elengedhetetlen volt ennek mérése. Az enzimek tulajdonságait a hőmérséklet függvényében vizsgáltuk, ezért ebben a mérési sorozatban is több hőmérsékleten mértünk, azonban a bonyolult és nagy anyagigényű H/D kicserélődés mérés miatt csak 4 hőmérsékleti ponton végeztük el a méréseket: 30, 50, 60, és 70 °C-on. A magasabb hőmérséklettartomány mellett a termofil enzim miatt döntöttem. A mérési eredmények szerint a mutánsok globális flexibilitása a várakozásnak megfelelően, a beépített glicinek számával arányosan növekedett (38-40. ábra), s ez a tulajdonság gyakorlatilag az összes mérési hőmérsékleten megfigyelhető volt.

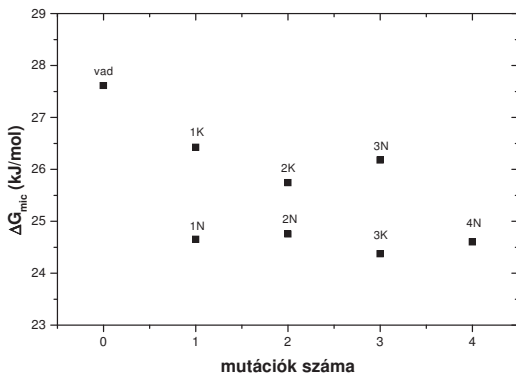


38. ábra: A P-G mutációk hatása a TtIPMDH konformációs flexibilitására a mutációk számának függvényében. A H/D kicserélődési görbéket relaxációs spektrum formában ábrázoltam. Az ábrán a 30°C-on történt mérés adatait mutatom be. Az eredmények alapján a mutációk hatása azonos és additív.

Ez az eredmény megerősítette azt a feltételezést, hogy egy ilyen egyszerű módon flexibilisebb enzimeket lehet előállítani.



39. ábra: A *TlIPMDH* mutánsainak konformációs flexibilitásának hőmérsékletfüggése. A mutánsok flexibilitása a magasabb hőmérséklettartományban nő meg a vad típushoz képest.



40. ábra: A *TlIPMDH* mutánsainak konformációs flexibilitása a mutációk számának függvényében. Az ábrán a 60°C-on készült mérések eredménye látszik.

A mutáns enzimek hőstabilitása

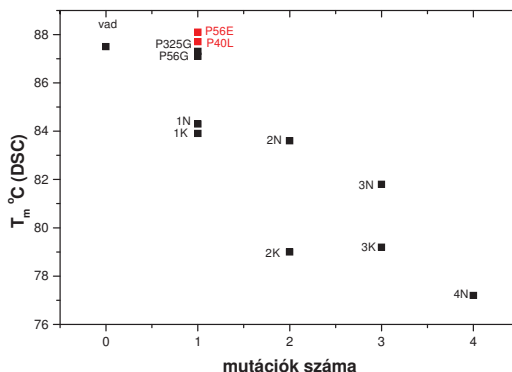
A fehérjék hőstabilitását két független méréssel, kalorimetriával és spektropolarimetriával vizsgáltam. A két módszerrel kapott eredmények megegyeznek, így együtt tárgyalom az

eredményeket, amelyeket következő táblázatban foglaltam össze (6. táblázat).

	vad	P40G	P26G	P56G	P325G	P40L	P56E	2K	2N	3K	3N	4NK
T_m (CD) (°C)	87,4	82,5	82,8	86,5	86,8	87,3	87,6	77,1	81,4	77,7	80,2	75,7
T_m (DSC) (°C)	87,5	83,9	84,3	87,1	87,3	87,7	88,1	79,0	83,6	79,2	81,8	77,2

6. táblázat: Mutációk hatása a *TlIPMDH* hőstabilitására. A prolinok cseréje glicinre jellemzően csökkenti az *IPMDH* hőstabilitását, és a többszörös mutációk esetén hatásuk akumulálódik, bár nem minden mutáció hatása azonos. A 2K mutáció esetén a két oldallánc közel van egymáshoz, így várhatóan a hatásuk nem független egymástól

A hődenaturáció minden esetben irreverzibilisnek bizonyult, így csak az azonos mérési körülmények között végzett felfűtési kísérletben meghatározott olvadáspontokat tudtam összehasonlítani. A mérések szerint a P-G mutánsok olvadáspontja a mutációk számával arányosan csökken, kb. 2-3 °C/mutáció értékben (41.ábra). Kiemelhető a P40G+P56G (2K) mutáns, amelynek hőstabilitása kisebb volt a várhatónál, és még annál a háromszoros mutánsnál (3K) is, amely ezek mellett még a P267G mutációt is tartalmazza. Az ellenőrzésképpen elkészült két mutánsnak (P40L és P56E) a hőstabilitása viszont nem változott meg a vad típushoz képest.



41. ábra: A *TlIPMDH* többszörös glicin-prolin mutánsainak hőstabilitása a mutációk számának függvényében. Jól megfigyelhető a mutációk számával arányosan csökkenő hőstabilitás.

A mutáns enzimek aktivitása

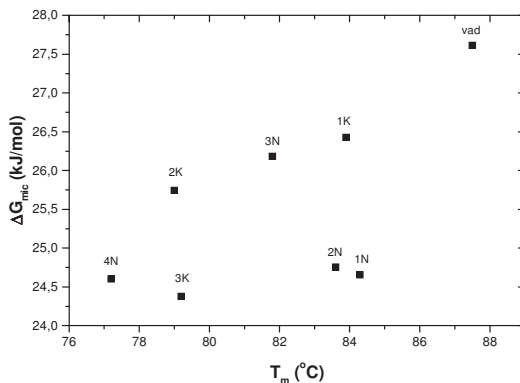
Az enzimaktivitás-méréseket a hőmérséklet függvényében végeztük el, így a mutációk enzimaktivitására gyakorolt hatását részletesebben tudtuk vizsgálni (7. táblázat) (tehát nem csak egy arányt tudunk mondani, hanem esetleges hőmérsékletoptimum-eltolódást is detektálni lehet). A P325G mutációt tartalmazó enzimek aktivitása nagyon jelentősen visszaesett, ez egyértelműen azt mutatta, hogy ez a mutáció nemcsak a fehérje konformációs flexibilitását változtatja meg, hanem valamilyen mértékben a katalízisben szerepet játszó konformációt is megbotlygatja, emiatt az ezt a mutációt tartalmazó változatok aktivitását az eredeti célkitűzés alapján nem vettem figyelembe. A további mutációk esetén az egyszeres mutációk az aktivitásra szinte nem gyakoroltak hatást, míg a P40G+P56G mutáns aktivitása kismértékben a vad típusnál nagyobbnak bizonyult. Az értelmezhető háromszoros mutáns esetén az enzimaktivitás 50%-ra esett vissza. A kontrollként elkészített mutánsok esetén nem tapasztalható szignifikáns eltérés a vad típustól.

	P40G	P56G	P267G	P325G	P40L	P56E	2N	2K	3N	3K	4N
30 °C	0,91	0,86	0,85	0,08	0,85	1,00	0,05	1,15	0,02	0,70	0,02
50 °C	0,89	1,02	0,68	0,09	1,00	1,14	0,05	1,22	0,02	0,44	0,02
60 °C	0,71	1,08	0,54	0,09	1,01	1,04	0,03	0,99	0,02	0,31	0,02

7. táblázat: A flexibilitásukban módosított mutáns *TtIPMDH* enzimek relatív aktivitása (a vad típus aktivitását minden hőmérsékleten egységnyiinek tekintettem). A táblázatban csak néhány hőmérsékleti ponton mért eredményt tüntettem fel.

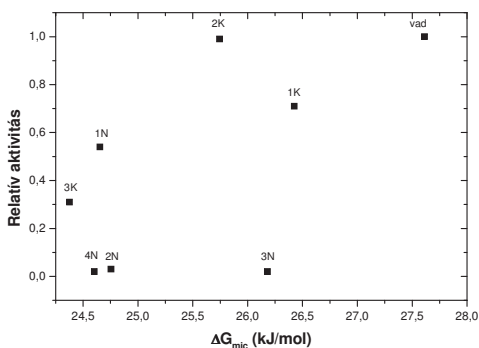
Következtetések a flexibilitásnövelő mutációkról

Összegzősképpen, az eredmények arra utalnak, hogy az enzimváltozatok csökkent hőstabilitása összefüggésben áll a flexibilitás növekedésével (42. ábra).



42. ábra: A TrpPMDH mutánsok hőstabilitásának és konformációs flexibilitásának összehasonlítása. Az esetek többségében jó korreláció található a mutánsok hőstabilitása és flexibilitása között, viszont néhány mutáns viselkedése nem illeszkedik a sorozatba.

Az enzimaktivitás a mutációk többségénél csökkent (43. ábra), egy esetben tapasztaltunk növekedést, és figyelemre méltó módon éppen annál a mutánsnál, amelynél a legnagyobb volt a hőstabilitás-csökkenés. Megfelelően kiválasztott mutációkkal tehát lehetséges az enzimaktivitás növelése a hőstabilitás rovására, azonban ez nem általános megfigyelés.



43. ábra: A mutáns TrpPMDH enzimek relatív aktivitása a flexibilitásuk függvényében. Nem mutatható direkt összefüggés az enzimek konformációs flexibilitása és aktivitása között, a flexibilitás növelésével az aktivitás inkább csökken.

Eredményeim alapján megállapítható, hogy a mutáns enzimek hőstabilitása és konformációs flexibilitása között van összefüggés, noha a korreláció nem tökéletes. Az enzimaktivitás és flexibilitás között összefüggés nem mutatható ki. A mutánsok nagyobb része nem viselkedik az elgondolásnak megfelelően: a P325G mutáció az enzimaktivitásra jelentős negatív hatással van, míg a P267G mutáció a konformációs flexibilitást a várható értéknél növeli meg jobban. Az egyszerűbb fizikai paraméterek (hőstabilitás, flexibilitás) módosítására az egyszerű, pontmutációkon alapuló módszer elégséges, viszont az enzimaktivitás módosítására ez az eljárás nem alkalmas. A tapasztalat szerint az enzimek katalitikus tulajdonságainak módosítására vonatkozó mutánsok tervezésénél az enzima tulajdonságait meghatározó kölcsönhatások csak kis részét tudjuk figyelembe venni. A mutációk során a lokális változásokon kívül globális hatások is jelentkeznek, ezeket azonban csak kísérleti úton tudjuk megfigyelni. Ezek a kísérletek az mutatják, hogy annak ellenére, hogy bizonyos esetekben bizonyos típusú konformációs flexibilitások és bizonyos enzimkinetikai mérőszámok között összefüggés található, a flexibilitás és az aktivitás között nincsen általános, direkt, egyszerű összefüggés, amelyet felhasználhatnánk az aktivitás növelésére olyan naiv módon, mint pl. a flexibilitás növelése a prolinok glicinekre cserélésével.

Az utolsó mérési sorozatban a konformációs flexibilitás enzimaktivitásra gyakorolt direkt hatását vizsgáltam. A mutációk segítségével a konformációs flexibilitás ugyan megnövelhető, azonban ez az enzimaktivitás szintjén nem tükröződik, mivel a flexibilitásnak csak bizonyos módusaiba tudunk beavatkozni, ami nem feltétlenül az aktivitással csatolt módus, illetve a mutációk egyéb hatásait nem tudjuk kizárni. Ez az eredmény is rámutat arra, hogy a konformációs flexibilitás és az aktivitás között van összefüggés, azonban a flexibilitás az enzim konformációs fluktuációinak összességének bizonyos mértéke, ezek között az aktivitással szoros kapcsolatban levő fluktuációk csak a megfigyelhető mozgások kis részét alkotják.

Összefoglalás

Munkám során azt vizsgáltam, miként valósul meg az enzimek szintjén a környezeti hőmérséklethez való alkalmazkodás. Hogyan tükröződik a katalitikus aktivitás megváltozott hőmérsékleti optimuma a fehérjék konformációs stabilitásában és szerkezeti flexibilitásában. Arra a kérdésre is választ kerestem, hogy milyen fizikai kölcsönhatások biztosítják a fehérjéknek a környezeti feltételekhez – elsősorban a környezeti hőmérséklethez történő alkalmazkodását az atomi kölcsönhatások és mozgások szintjén. Modellenzímként a GAPDH és IPMDH enzimekre esett a választás, a kutatócsoport korábbi eredményei alapján.

A GAPDH enzimek mezofil és termofil változatának vizsgálata során arra kerestem a választ, hogy miként valósul meg a magas hőmérséklethez való alkalmazkodás az enzimek konformációs flexibilitásában és stabilitásában.

A GAPDH enzim két ortológja, a termofil *Thermotoga maritima*, valamint a nyúlból származó változata által katalizált reakció hőmérsékletfüggése egyaránt jelentős eltérést mutat a klasszikus arrheniusi lineáris viselkedéstől, azonban az észlelhető töréspont hőmérséklete a *Tm*GAPDH esetében 17°C-kal magasabb, mint a nyúlból származó enzimnél. A H/D kicserélődés vizsgálatok azt mutatják, hogy szobahőmérsékleten a *Tm*GAPDH konformációs flexibilitása alacsonyabb, viszont a hőmérsékleti optimumokon összehasonlítva a két enzim flexibilitását, azok megegyeznek, ennek alapján az enzimaktivitás nemarrheniusi hőmérsékletfüggése a konformációs dinamikával hozható összefüggésbe. A szerkezetek B-faktorainak analízise alapján a flexibilitás különbsége az enzimek koenzim- és szubsztrátkötő régióiban a legjelentősebb.

Ez az eredmény azt sugallja, hogy a konformációs flexibilitás és az enzimaktivitás között általános összefüggés állhat fenn: a túlzottan merev szerkezet alacsony aktivitáshoz vezet, a nagyobb flexibilitás pedig az aktivitást is növeli.

Az IPMDH enzimváltozatok hőmérsékleti adaptációját megvizsgálva kerestem arra a kérdésre a választ, hogy mennyire tekinthető általánosnak az a megfigyelés, hogy a konformációs flexibilitás beállítása a hőmérsékleti adaptáció fő stratégiája, vagy egyéb alkalmazkodási lehetőségek is megvalósulnak.

A termofil, mezofil és hidegtűrő IPMDH enzim az aktivitási paraméterek hőmérsékletfüggése tekintetében nagyon hasonlóan viselkedik. A hőmérsékletfüggést leíró Arrhenius és van't

Hoff ábrázolások alakja megegyezik, a különbség az abszolút értékekben található: az enzimek aktivitása a hőstabilitásukkal fordítottan arányos. Megállapítható, hogy az enzimek működésével járó alapvető dinamikus folyamatok a hőmérsékleti adaptáció során nem változtak meg jelentősen, csak a hőmérsékleti optimumuk tolódott el a megkívánt irányba. A hidegtűrő *Vibrio* sp. 15 IPMDH hideghez való alkalmazkodásának stratégiája eltér a hidegkedvelő élőlények enzimeinél gyakorta megfigyelt, magas konformációs flexibilitással és hőlabilitással jellemezhető stratégiától. Ebben az esetben az alkalmazkodás a teljes hőmérsékleti tartományban jobb katalitikus aktivitás révén valósul meg, az enzim viszonylag magas hőstabilitása mellett.

Megfigyelésünk szerint az *E. coli* IPMDH által katalizált reakcióban a szubsztrátra vonatkozó Michaelis-Menten állandó hőmérsékletfüggésének van't Hoff ábrázolása szigmoid lefutást mutat. Arra a kérdésre kerestem a választ, hogy milyen fizikai kölcsönhatások következménye ez a korábban nem tapasztalt hőmérsékletfüggés. Feltételezésünk szerint a fehérje dinamikájának hőmérsékletfüggő változásai okozhatják a változást, kísérleteimmel a változás pontos okát kerestem.

CD és DSC méréseim szerint a szigmoid változást nem konformációváltozás okozza. A H/D kicserélődés mérésekből meghatározott ΔG_{mic} mikrostabilitási szabadentalpia-értékek hőmérsékletfüggése azt mutatja, hogy 30°C-on – ami megfelel a disszociációs állandó szigmoid átmenete középpontjának – a szabadentalpia jelentősen csökken, ami a konformációs flexibilitás növekedését, új fluktuációk megjelenését indikálja.

A nagyobb mérvű konformációs mozgásokat (domének egymáshoz képesti elmozdulását) FRET mérésekkel jellemeztem. A FRET-hatékonyságnak a donoremisszióval való korrekciójával kapott f'' paraméter értéke jellemzi a fehérje dinamikáját, ebben az esetben a domének egymáshoz viszonyított relatív fluktuációjának amplitúdóját. Az f'' értéke az IPM-mentes NADH-IPMDH komplexben 30°C környékén jelentősen emelkedik, ami a konformációs fluktuációk nagyobb amplitúdójával magyarázható.

Az IPMDH katalitikus hatékonysága (k_{cat}/K_M) szélesebb hőmérséklettartományban sem változik lényegesen, ezt az enzim-szubsztrát kölcsönhatás hőmérsékletfüggése okozza. Magasabb hőmérsékleten a szubsztrát affinitása alacsonyabb, a csökkenő affinitás hátterében két folyamat együttes hatása állhat: a domén-domén mozgások, valamint a lokális fluktuációk hatása. A kísérleti eredmények alapján a szubsztrát kötődése „induced fit” mechanizmus szerint megy végbe. A magasabb hőmérsékleten talált nagyobb amplitúdójú „hinge-bending” fluktuációk megnehezítik az IPM kötődését, ezáltal csökkentik az enzim affinitását a

szubsztráthoz, és ez a fő okozója a $K_{M,IPM}$ szigmoid jellegű növekedésének a 20–40°C hőmérséklettartományban, ennek következményében alakul ki az IPMDH katalitikus hatékonyságának rendellenes hőmérsékletfüggése.

Az IPMDH esetében tehát közvetlen összefüggést találtunk a konformációs flexibilitás egy bizonyos típusa – a relatív doménmozgásokhoz tartozó flexibilitás – és az enzimaktivitással összefüggő egy bizonyos paraméter – a szubsztrát disszociációs állandója – között. Az intenzívebb fluktuációk megnehezítik a szubsztrát kötődését, ezzel csökkentve a katalitikus hatékonyságot. A flexibilitás–aktivitás összefüggésnek tehát még az iránya is attól függ, milyen típusú flexibilitást és milyen aktivitási mérőszámot vizsgálunk.

A korábbi tapasztalatok szerint a nagyobb flexibilitással rendelkező enzimek rendszerint nagyobb enzimatisz aktivitással rendelkeznek. Arra a kérdésre is választ kerestem, hogy egy enzim konformációs flexibilitásának megnövelése célzott mutációkkal milyen hatást gyakorol az enzim aktivitására.

Kísérleteim szerint a konformációs flexibilitás növelése mutációk révén a nemkonzervált prolinok glicinre való cseréje útján megvalósítható, ezt H/D kicserélődés mérések alátámasztják. A *TlIPMDH* így létrehozott mutánsainak hőstabilitása alacsonyabb a vad típusnál, a beépített glicinek számával arányosan. A mutáns enzimek hőstabilitása és konformációs flexibilitása között van összefüggés, noha a korreláció nem tökéletes. Az enzimaktivitás és flexibilitás között összefüggés nem mutatható ki. Az egyszerűbb fizikai paraméterek (hőstabilitás, flexibilitás) módosítására az egyszerű, pontmutációkon alapuló módszer megfelelő viszont az enzimaktivitás módosítására ez az eljárás nem alkalmas.

Ezek a kísérletek az mutatják, hogy annak ellenére, hogy bizonyos esetekben bizonyos típusú konformációs flexibilitások és bizonyos enzimkinetikai mérőszámok között összefüggés található, a flexibilitás és az aktivitás között nincsen általános, direkt, egyszerű összefüggés, amelyet felhasználhatnánk az aktivitás növelésére. A flexibilitás bizonyos fajtáinak szerepe van az enzimműködés bizonyos részfolyamataiban, ilyenkor korreláció is kimutatható. A katalitikus funkció azonban több tényező összjátékának az eredménye, melyek közül csupán az egyik a flexibilitás. Ennek köszönhető az környezeti adaptáció természetben megfigyelt stratégiáinak sokfélesége.

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó közlemények

Svingor A, Kardos J, Hajdú I, Németh A, Závodszy P. (2001)

A better enzyme to cope with cold. Comparative flexibility studies on psychrotrophic, mesophilic, and thermophilic IPMDHs.

J. Biol. Chem. **276**, 28121-28125.

IF: 7,258

Grácz E, Varga A, Hajdú I, Melnik B, Szilágyi A, Semisotnov G, Závodszy P, Vas M. (2007)

Rates of unfolding, rather than refolding, determine thermal stabilities of thermophilic, mesophilic, and psychrotrophic 3-isopropylmalate dehydrogenases.

Biochemistry. **46**, 11536-11549.

IF: 3,368

Hajdú I, Bóthe C, Szilágyi A, Kardos J, Gál P, Závodszy P. (2008)

Adjustment of conformational flexibility of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a means of thermal adaptation and allosteric regulation.

Eur Biophys J. **37**, 1139-1144.

IF: 2,234

Hajdú I, Szilágyi A, Kardos J, Závodszy P (2008)

A link between hinge-bending domain motions and the temperature dependence of catalysis in IPMDH

Biophys J, közlésre beküldve

Az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó közlemények

Debreczeni JE, Farkas L, Harmat V, Hetényi C, Hajdu I, Závodszy P, Kohama K, Nyitrai L. (2005)

Structural evidence for non-canonical binding of Ca²⁺ to a canonical EF-hand of a conventional myosin.

J. Biol. Chem. **280**, 41458-41464.

IF: 5,854

Flachner B, Varga A, Szabó J, Barna L, Hajdú I, Gyimesi G, Závodszy P, Vas M. (2005)

Substrate-assisted movement of the catalytic Lys 215 during domain closure: site-directed mutagenesis studies of human 3-phosphoglycerate kinase.

Biochemistry. **44**, 16853-16865.

IF: 3,848

Irodalomjegyzék

1. Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D., Somero, G.N. (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**, 1214-1222
2. van de Vossenberg, J.L., Driessen, A.J., Konings, W.N. (1998) The essence of being extremophilic: the role of the unique archaeal membrane lipids. *Extremophiles* **2**, 163-170
3. Jaenicke, R., Závodszky, P. (1990) Proteins under extreme physical conditions. *FEBS Lett* **268**, 344-349
4. Rees, D.C., Adams, M.W. (1995) Hyperthermophiles: taking the heat and loving it. *Structure* **3**, 251-254
5. Vieille, C., Zeikus, G.J. (2001) Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**, 1-43
6. Jaenicke, R., Böhm, G. (1998) The stability of proteins in extreme environments. *Curr Opin Struct Biol* **8**, 738-748
7. Sterner, R., Liebl, W. (2001) Thermophilic adaptation of proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **36**, 39-106
8. Kumar, S., Nussinov, R. (2001) How do thermophilic proteins deal with heat? *Cell Mol Life Sci* **58**, 1216-1233
9. Razvi, A., Scholtz, J.M. (2006) Lessons in stability from thermophilic proteins. *Protein Sci* **15**, 1569-1578
10. Pace, C.N. (1975) The stability of globular proteins. *CRC Crit Rev Biochem* **3**, 1-43
11. Lopez, M.M., Makhatadze, G.I. (2002) Differential scanning calorimetry. *Methods Mol Biol* **173**, 113-119
12. Pace, C.N., Shaw, K.L. (2000) Linear extrapolation method of analyzing solvent denaturation curves. *Proteins Suppl* **4**, 1-7
13. Becktel, W.J., Schellman, J.A. (1987) Protein stability curves. *Biopolymers* **26**, 1859-1877
14. Nojima, H., Ikai, A., Oshima, T., Noda, H. (1977) Reversible thermal unfolding of thermostable phosphoglycerate kinase. Thermostability associated with mean zero enthalpy change. *J Mol Biol* **116**, 429-442
15. Kumar, M.D.S., Bava, K.A., Gromiha, M.M., Prabakaran, P., Kitajima, K., Uedaira, H., Sarai, A. (2006) ProTherm and ProNIT: thermodynamic databases for proteins and protein-nucleic acid interactions. *Nucleic Acids Res* **34**, D204-6
16. Beadle, B.M., Baase, W.A., Wilson, D.B., Gilkes, N.R., Shoichet, B.K. (1999) Comparing the thermodynamic stabilities of a related thermophilic and mesophilic enzyme. *Biochemistry* **38**, 2570-2576
17. Dahiyat, B.I. (1999) In silico design for protein stabilization. *Curr Opin Biotechnol* **10**, 387-390
18. Russell, R.J., Ferguson, J.M., Hough, D.W., Danson, M.J., Taylor, G.L. (1997) The crystal structure of citrate synthase from the hyperthermophilic archaeon *pyrococcus furiosus* at 1.9 Å resolution. *Biochemistry* **36**, 9983-9994
19. Salminen, T., Teplyakov, A., Kankare, J., Cooperman, B.S., Lahti, R., Goldman, A. (1996) An unusual route to thermostability disclosed by the comparison of *Thermus thermophilus* and *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatases. *Protein Sci* **5**, 1014-1025

-
20. Karshikoff, A., Ladenstein, R. (1998) Proteins from thermophilic and mesophilic organisms essentially do not differ in packing. *Protein Eng* **11**, 867-872
 21. Zuber, H. (1988) Temperature adaptation of lactate dehydrogenase. Structural, functional and genetic aspects. *Biophys Chem* **29**, 171-179
 22. Haney, P., Konisky, J., Koretke, K.K., Luthey-Schulten, Z., Wolynes, P.G. (1997) Structural basis for thermostability and identification of potential active site residues for adenylate kinases from the archaeal genus *Methanococcus*. *Proteins* **28**, 117-130
 23. Bogin, O., Peretz, M., Hacham, Y., Korkhin, Y., Frolow, F., Kalb(Gilboa), A.J., Burstein, Y. (1998) Enhanced thermal stability of *Clostridium beijerinckii* alcohol dehydrogenase after strategic substitution of amino acid residues with prolines from the homologous thermophilic *Thermoanaerobacter brockii* alcohol dehydrogenase. *Protein Sci* **7**, 1156-1163
 24. Kumar, S., Tsai, C.J., Nussinov, R. (2000) Factors enhancing protein thermostability. *Protein Eng* **13**, 179-191
 25. Querol, E., Perez-Pons, J.A., Mozo-Villarias, A. (1996) Analysis of protein conformational characteristics related to thermostability. *Protein Eng* **9**, 265-271
 26. Vogt, G., Woell, S., Argos, P. (1997) Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs. *J Mol Biol* **269**, 631-643
 27. Gromiha, M.M., Oobatake, M., Sarai, A. (1999) Important amino acid properties for enhanced thermostability from mesophilic to thermophilic proteins. *Biophys Chem* **82**, 51-67
 28. Ladenstein, R., Antranikian, G. (1998) Proteins from hyperthermophiles: stability and enzymatic catalysis close to the boiling point of water. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **61**, 37-85
 29. Szilágyi, A., Závodszky, P. (2000) Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive survey. *Structure* **8**, 493-504
 30. Chakravarty, S., Varadarajan, R. (2000) Elucidation of determinants of protein stability through genome sequence analysis. *FEBS Lett* **470**, 65-69
 31. Thompson, M.J., Eisenberg, D. (1999) Transproteomic evidence of a loop-deletion mechanism for enhancing protein thermostability. *J Mol Biol* **290**, 595-604
 32. Zhang, J. (2000) Protein-length distributions for the three domains of life. *Trends Genet* **16**, 107-109
 33. Feller, G., Gerday, C. (2003) Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nat Rev Microbiol* **1**, 200-208
 34. Bakermans, C., Neilson, K.H. (2004) Relationship of critical temperature to macromolecular synthesis and growth yield in *Psychrobacter cryopegella*. *J Bacteriol* **186**, 2340-2345
 35. Berger, F., Morellet, N., Menu, F., Potier, P. (1996) Cold shock and cold acclimation proteins in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter globiformis* SI55. *J Bacteriol* **178**, 2999-3007
 36. Jia, Z., DeLuca, C.I., Chao, H., Davies, P.L. (1996) Structural basis for the binding of a globular antifreeze protein to ice. *Nature* **384**, 285-288
 37. Russell, N.J. (1997) Psychrophilic bacteria--molecular adaptations of membrane lipids. *Comp Biochem Physiol A Physiol* **118**, 489-493
 38. Georlette, D., Blaise, V., Collins, T., D'Amico, S., Gratia, E., Hoyoux, A., Marx, J., Sonan, G., Feller, G., Gerday, C. (2004) Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. *FEMS Microbiol Rev* **28**, 25-42

39. Smalås, A.O., Leiros, H.K., Os, V., Willassen, N.P. (2000) Cold adapted enzymes. *Biotechnol Annu Rev* **6**, 1-57
40. Russell, N.J. (2000) Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles. *Extremophiles* **4**, 83-90
41. Leiros, H.K., Willassen, N.P., Smalås, A.O. (2000) Structural comparison of psychrophilic and mesophilic trypsins. Elucidating the molecular basis of cold-adaptation. *Eur J Biochem* **267**, 1039-1049
42. Gianese, G., Bossa, F., Pascarella, S. (2002) Comparative structural analysis of psychrophilic and meso- and thermophilic enzymes. *Proteins* **47**, 236-249
43. Feller, G., d'Amico, D., Gerday, C. (1999) Thermodynamic stability of a cold-active alpha-amylase from the Antarctic bacterium *Alteromonas haloplanctis*. *Biochemistry* **38**, 4613-4619
44. D'Amico, S., Gerday, C., Feller, G. (2001) Structural determinants of cold adaptation and stability in a large protein. *J Biol Chem* **276**, 25791-25796
45. Dill, K.A., Chan, H.S. (1997) From Levinthal to pathways to funnels. *Nat Struct Biol* **4**, 10-19
46. Dobson, C.M., Karplus, M. (1999) The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment. *Curr Opin Struct Biol* **9**, 92-101
47. Dinner, A.R., Sali, A., Smith, L.J., Dobson, C.M., Karplus, M. (2000) Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment. *Trends Biochem Sci* **25**, 331-339
48. D'Amico, S., Marx, J., Gerday, C., Feller, G. (2003) Activity-stability relationships in extremophilic enzymes. *J Biol Chem* **278**, 7891-7896
49. Kumar, S., Ma, B., Tsai, C.J., Sinha, N., Nussinov, R. (2000) Folding and binding cascades: dynamic landscapes and population shifts. *Protein Sci* **9**, 10-19
50. Somero, G.N. (1995) Proteins and temperature. *Annu Rev Physiol* **57**, 43-68
51. Lonhienne, T., Gerday, C., Feller, G. (2000) Psychrophilic enzymes: revisiting the thermodynamic parameters of activation may explain local flexibility. *Biochim Biophys Acta* **1543**, 1-10
52. Collins, T., Meuwis, M., Gerday, C., Feller, G. (2003) Activity, stability and flexibility in glycosidases adapted to extreme thermal environments. *J Mol Biol* **328**, 419-428
53. Fields, P.A., Somero, G.N. (1998) Hot spots in cold adaptation: localized increases in conformational flexibility in lactate dehydrogenase A4 orthologs of Antarctic notothenioid fishes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11476-11481
54. Bentahir, M., Feller, G., Aittaleb, M., Lamotte-Brasseur, J., Himri, T., Chessa, J.P., Gerday, C. (2000) Structural, kinetic, and calorimetric characterization of the cold-active phosphoglycerate kinase from the antarctic *Pseudomonas* sp. TACII18. *J Biol Chem* **275**, 11147-11153
55. Hoyoux, A., Jennes, I., Dubois, P., Genicot, S., Dubail, F., François, J.M., Baise, E., Feller, G., Gerday, C. (2001) Cold-adapted beta-galactosidase from the Antarctic psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 1529-1535
56. Lonhienne, T., Zoidakis, J., Vorgias, C.E., Feller, G., Gerday, C., Bouriotis, V. (2001) Modular structure, local flexibility and cold-activity of a novel chitobiase from a psychrophilic Antarctic bacterium. *J Mol Biol* **310**, 291-297

57. D'Amico, S., Claverie, P., Collins, T., Georlette, D., Gratia, E., Hoyoux, A., Meuwis, M., Feller, G., Gerday, C. (2002) Molecular basis of cold adaptation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **357**, 917-925
58. Závodszky, P., Kardos, J., Svingor, Petsko, G.A. (1998) Adjustment of conformational flexibility is a key event in the thermal adaptation of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7406-7411
59. Jaenicke, R. (1991) Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *Eur J Biochem* **202**, 715-728
60. Jaenicke, R. (1996) Protein folding and association: in vitro studies for self-organization and targeting in the cell. *Curr Top Cell Regul* **34**, 209-314
61. Jaenicke, R. (1998) What ultrastable globular proteins teach us about protein stabilization. *Biochemistry (Mosc)* **63**, 312-321
62. Scandurra, R., Consalvi, V., Chiaraluce, R., Politi, L., Engel, P.C. (2000) Protein stability in extremophilic archaea. *Front Biosci* **5**, D787-95
63. Dill, K.A. (1990) Dominant forces in protein folding. *Biochemistry* **29**, 7133-7155
64. Doig, A.J., Williams, D.H. (1991) Is the hydrophobic effect stabilizing or destabilizing in proteins? The contribution of disulphide bonds to protein stability. *J Mol Biol* **217**, 389-398
65. Ragone, R., Colonna, G. (1995) Do globular proteins require some structural peculiarity to best function at high temperatures? *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 16-20
66. Pace, C.N., Shirley, B.A., McNutt, M., Gajiwala, K. (1996) Forces contributing to the conformational stability of proteins. *FASEB J* **10**, 75-83
67. Aguilar, C.F., Sanderson, I., Moracci, M., Ciamarella, M., Nucci, R., Rossi, M., Pearl, L.H. (1997) Crystal structure of the beta-glycosidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*: resilience as a key factor in thermostability. *J Mol Biol* **271**, 789-802
68. Ichikawa, J.K., Clarke, S. (1998) A highly active protein repair enzyme from an extreme thermophile: the L-isoaspartyl methyltransferase from *Thermotoga maritima*. *Arch Biochem Biophys* **358**, 222-231
69. Merz, A., Knöchel, T., Jansonius, J.N., Kirschner, K. (1999) The hyperthermostable indoleglycerol phosphate synthase from *Thermotoga maritima* is destabilized by mutational disruption of two solvent-exposed salt bridges. *J Mol Biol* **288**, 753-763
70. Hvidt, A. (1964) A discussion of the pH dependence of the hydrogen-deuterium exchange of proteins. *C R Trav Lab Carlsberg* **34**, 299-317
71. Hvidt, A., Nielsen, S.O. (1966) Hydrogen exchange in proteins. *Adv Protein Chem* **21**, 287-386
72. Závodszky, P., Johansen, J.T., Hvidt, A. (1975) Hydrogen-exchange study of the conformational stability of human carbonic-anhydrase B and its metallocomplexes. *Eur J Biochem* **56**, 67-72
73. Závodszky, P., Jaton, J.C., Venyaminov, S.Y., Medgyesi, G.A. (1981) Increase of conformational stability of homogeneous rabbit immunoglobulin G after hapten binding. *Mol Immunol* **18**, 39-46
74. Englander, S.W. (2006) Hydrogen exchange and mass spectrometry: A historical perspective. *J Am Soc Mass Spectrom* **17**, 1481-1489
75. Busenlehner, L.S., Armstrong, R.N. (2005) Insights into enzyme structure and dynamics elucidated by amide H/D exchange mass spectrometry. *Arch Biochem Biophys* **433**, 34-46

76. Legge, G.B., Kriwacki, R.W., Chung, J., Hommel, U., Ramage, P., Case, D.A., Dyson, H.J., Wright, P.E. (2000) NMR solution structure of the inserted domain of human leukocyte function associated antigen-1. *J Mol Biol* **295**, 1251-1264
77. Hernandez, G., Jenney, F.E.J., Adams, M.W., LeMaster, D.M. (2000) Millisecond time scale conformational flexibility in a hyperthermophile protein at ambient temperature. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3166-3170
78. Georlette, D., Damien, B., Blaise, V., Depiereux, E., Uversky, V.N., Gerday, C., Feller, G. (2003) Structural and functional adaptations to extreme temperatures in psychrophilic, mesophilic, and thermophilic DNA ligases. *J Biol Chem* **278**, 37015-37023
79. Fitter, J., Haber-Pohlmeier, S. (2004) Structural stability and unfolding properties of thermostable bacterial alpha-amylases: a comparative study of homologous enzymes. *Biochemistry* **43**, 9589-9599
80. Gonnelli, M., Strambini, G.B. (2005) Intramolecular quenching of tryptophan phosphorescence in short peptides and proteins. *Photochem Photobiol* **81**, 614-622
81. Fitter, J., Herrmann, R., Dencher, N.A., Blume, A., Hauss, T. (2001) Activity and stability of a thermostable alpha-amylase compared to its mesophilic homologue: mechanisms of thermal adaptation. *Biochemistry* **40**, 10723-10731
82. Ringe, D., Petsko, G.A. (1986) Study of protein dynamics by X-ray diffraction. *Methods Enzymol* **131**, 389-433
83. Bertini, I., Luchinat, C., Niikura, Y., Presenti, C. (2000) Model-free analysis of a thermophilic Fe(7)S(8) protein compared with a mesophilic Fe(4)S(4) protein. *Proteins* **41**, 75-85
84. Eissenthal, R., Danson, M.J., Hough, D.W. (2007) Catalytic efficiency and kcat/KM: a useful comparator? *Trends Biotechnol* **25**, 247-249
85. Spies, M., Kil, Y., Masui, R., Kato, R., Kujo, C., Ohshima, T., Kuramitsu, S., Lanzov, V. (2000) The RadA protein from a hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum islandicum* is a DNA-dependent ATPase that exhibits two disparate catalytic modes, with a transition temperature at 75 degrees C. *Eur J Biochem* **267**, 1125-1137
86. Hensel, R., Laumann, S., Lang, J., Heumann, H., Lottspeich, F. (1987) Characterization of two D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from the extremely thermophilic archaeobacterium *Thermoproteus tenax*. *Eur J Biochem* **170**, 325-333
87. Londerborough, J. (1980) The causes of sharply bent or discontinuous Arrhenius plots for enzyme-catalysed reactions. *Eur J Biochem* **105**, 211-215
88. Demchenko, A.P. (1997) Breaks in Arrhenius plots for enzyme reactions: the switches between different protein dynamics regimes? *Comments Mol Cell Biophys* **9**, 87-112
89. Truhlar, D., Kohen, A. (2001) Convex Arrhenius plots and their interpretation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 848-851
90. Cornish-Bowden, A. (2002) Enthalpy-entropy compensation: a phantom phenomenon. *J Biosci* **27**, 121-126
91. Datta, K., Wowor, A.J., Richard, A.J., LiCata, V.J. (2006) Temperature dependence and thermodynamics of Klenow polymerase binding to primed-template DNA. *Biophys J* **90**, 1739-1751
92. Kuo, L.Y., Cech, T.R. (1996) Conserved thermochemistry of guanosine nucleophile binding for structurally distinct group I ribozymes. *Nucleic Acids Res* **24**, 3722-3727

93. Ciardiello, M.A., Camardella, L., di Prisco, G. (1995) Glucose-6-phosphate dehydrogenase from the blood cells of two antarctic teleosts: correlation with cold adaptation. *Biochim Biophys Acta* **1250**, 76-82
94. Szeltner, Z., Rea, D., Renner, V., Juliano, L., Fülöp, V., Polgár, L. (2003) Electrostatic environment at the active site of prolyl oligopeptidase is highly influential during substrate binding. *J Biol Chem* **278**, 48786-48793
95. Ayala, Y.M., Di Cera, E. (2000) A simple method for the determination of individual rate constants for substrate hydrolysis by serine proteases. *Protein Sci* **9**, 1589-1593
96. Malakauskas, S.M., Mayo, S.L. (1998) Design, structure and stability of a hyperthermophilic protein variant. *Nat Struct Biol* **5**, 470-475
97. Loladze, V.V., Ibarra-Molero, B., Sanchez-Ruiz, J.M., Makhataдзе, G.I. (1999) Engineering a thermostable protein via optimization of charge-charge interactions on the protein surface. *Biochemistry* **38**, 16419-16423
98. Schweiker, K.L., Zarrine-Afsar, A., Davidson, A.R., Makhataдзе, G.I. (2007) Computational design of the Fyn SH3 domain with increased stability through optimization of surface charge charge interactions. *Protein Sci* **16**, 2694-2702
99. Jäckel, C., Kast, P., Hilvert, D. (2008) Protein design by directed evolution. *Annu Rev Biophys* **37**, 153-173
100. Yuan, L., Kurek, I., English, J., Keenan, R. (2005) Laboratory-directed protein evolution. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**, 373-392
101. Violot, S., Aghajari, N., Czjzek, M., Feller, G., Sonan, G.K., Gouet, P., Gerday, C., Haser, R., Receveur-Bréchet, V. (2005) Structure of a full length psychrophilic cellulase from *Pseudoalteromonas haloplanktis* revealed by X-ray diffraction and small angle X-ray scattering. *J Mol Biol* **348**, 1211-1224
102. Tagaya, M., Yagami, T., Noumi, T., Futai, M., Kishi, F., Nakazawa, A., Fukui, T. (1989) Site-directed mutagenesis of Pro-17 located in the glycine-rich region of adenylate kinase. *J Biol Chem* **264**, 990-994
103. Vermersch, P.S., Tesmer, J.J., Lemon, D.D., Quirocho, F.A. (1990) A Pro to Gly mutation in the hinge of the arabinose-binding protein enhances binding and alters specificity. Sugar-binding and crystallographic studies. *J Biol Chem* **265**, 16592-16603
104. Kulakova, L., Galkin, A., Nakayama, T., Nishino, T., Esaki, N. (2004) Cold-active esterase from *Psychrobacter* sp. Ant300: gene cloning, characterization, and the effects of Gly→Pro substitution near the active site on its catalytic activity and stability. *Biochim Biophys Acta* **1696**, 59-65
105. Zheng, L., Roeder, R.G., Luo, Y. (2003) S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. *Cell* **114**, 255-266
106. Hara, M.R., Agrawal, N., Kim, S.F., Cascio, M.B., Fujimuro, M., Ozeki, Y., Takahashi, M., Cheah, J.H., Tankou, S.K., Hester, L.D., Ferris, C.D., Hayward, S.D., Snyder, S.H., Sawa, A. (2005) S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat Cell Biol* **7**, 665-674
107. Tisdale, E.J., Artalejo, C.R. (2007) A GAPDH mutant defective in Src-dependent tyrosine phosphorylation impedes Rab2-mediated events. *Traffic* **8**, 733-741
108. Dalziel, K., McFerran, N.V., Wonacott, A.J. (1981) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **293**, 105-118

109. Leslie, A.G., Wonacott, A.J. (1984) Structural evidence for ligand-induced sequential conformational changes in glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *J Mol Biol* **178**, 743-772
110. Conway, A., Koshland, D.E.J. (1968) Negative cooperativity in enzyme action. The binding of diphosphopyridine nucleotide to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* **7**, 4011-4023
111. Williams, D.H., Zhou, M., Stephens, E. (2006) Ligand binding energy and enzyme efficiency from reductions in protein dynamics. *J Mol Biol* **355**, 760-767
112. Wrba, A., Schweiger, A., Schultes, V., Jaenicke, R., Závodszy, P. (1990) Extremely thermostable D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the eubacterium *Thermotoga maritima*. *Biochemistry* **29**, 7584-7592
113. Korndörfer, I., Steipe, B., Huber, R., Tomschy, A., Jaenicke, R. (1995) The crystal structure of holo-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* at 2.5 Å resolution. *J Mol Biol* **246**, 511-521
114. Cowan-Jacob, S.W., Kaufmann, M., Anselmo, A.N., Stark, W., Grütter, M.G. (2003) Structure of rabbit-muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**, 2218-2227
115. Imada, K., Sato, M., Tanaka, N., Katsube, Y., Matsuura, Y., Oshima, T. (1991) Three-dimensional structure of a highly thermostable enzyme, 3-isopropylmalate dehydrogenase of *Thermus thermophilus* at 2.2 Å resolution. *J Mol Biol* **222**, 725-738
116. Imada, K., Inagaki, K., Matsunami, H., Kawaguchi, H., Tanaka, H., Tanaka, N., Namba, K. (1998) Structure of 3-isopropylmalate dehydrogenase in complex with 3-isopropylmalate at 2.0 Å resolution: the role of Glu88 in the unique substrate-recognition mechanism. *Structure* **6**, 971-982
117. Tsuchiya, D., Sekiguchi, T., Takenaka, A. (1997) Crystal structure of 3-isopropylmalate dehydrogenase from the moderate facultative thermophile, *Bacillus coagulans*: two strategies for thermostabilization of protein structures. *J Biochem* **122**, 1092-1104
118. Wallon, G., Kryger, G., Lovett, S.T., Oshima, T., Ringe, D., Petsko, G.A. (1997) Crystal structures of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* 3-isopropylmalate dehydrogenase and comparison with their thermophilic counterpart from *Thermus thermophilus*. *J Mol Biol* **266**, 1016-1031
119. Singh, R.K., Kefala, G., Janowski, R., Mueller-Dieckmann, C., von Kries, J., Weiss, M.S. (2005) The high-resolution Structure of LeuB (Rv2995c) from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Biol* **346**, 1-11
120. Tanaka, T., Kawano, N., Oshima, T. (1981) Cloning of 3-isopropylmalate dehydrogenase gene of an extreme thermophile and partial purification of the gene product. *J Biochem* **89**, 677-682
121. Yamada, T., Akutsu, N., Miyazaki, K., Kakinuma, K., Yoshida, M., Oshima, T. (1990) Purification, catalytic properties, and thermal stability of threo-Ds-3-isopropylmalate dehydrogenase coded by *leuB* gene from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* strain HB8. *J Biochem* **108**, 449-456
122. Motono, C., Yamagishi, A., Oshima, T. (1999) Urea-induced unfolding and conformational stability of 3-isopropylmalate dehydrogenase from the Thermophile *thermus thermophilus* and its mesophilic counterpart from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **38**, 1332-1337
123. Motono, C., Oshima, T., Yamagishi, A. (2001) High thermal stability of 3-isopropylmalate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* resulting from low $\Delta C(p)$ of unfolding. *Protein Eng* **14**, 961-966

124. Yasugi, M., Amino, M., Suzuki, T., Oshima, T., Yamagishi, A. (2001) Cold adaptation of the thermophilic enzyme 3-isopropylmalate dehydrogenase. *J Biochem* **129**, 477-484
125. Suzuki, T., Yasugi, M., Arisaka, F., Oshima, T., Yamagishi, A. (2002) Cold-adaptation mechanism of mutant enzymes of 3-isopropylmalate dehydrogenase from *Thermus thermophilus*. *Protein Eng* **15**, 471-476
126. Suzuki, T., Inoki, Y., Yamagishi, A., Iwasaki, T., Wakagi, T., Oshima, T. (1997) Molecular and phylogenetic characterization of isopropylmalate dehydrogenase of a thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus* sp. strain 7. *J Bacteriol* **179**, 1174-1179
127. Kirino, H., Aoki, M., Aoshima, M., Hayashi, Y., Ohba, M., Yamagishi, A., Wakagi, T., Oshima, T. (1994) Hydrophobic interaction at the subunit interface contributes to the thermostability of 3-isopropylmalate dehydrogenase from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *Eur J Biochem* **220**, 275-281
128. Wallon, G., Yamamoto, K., Kirino, H., Yamagishi, A., Lovett, S.T., Petsko, G.A., Oshima, T. (1997) Purification, catalytic properties and thermostability of 3-isopropylmalate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1337**, 105-112
129. Németh, A., Svingor, A., Pócsik, M., Dobó, J., Magyar, C., Szilágyi, A., Gál, P., Závodszy, P. (2000) Mirror image mutations reveal the significance of an intersubunit ion cluster in the stability of 3-isopropylmalate dehydrogenase. *FEBS Lett* **468**, 48-52
130. Wallon, G., Lovett, S.T., Magyar, C., Svingor, A., Szilágyi, A., Závodszy, P., Ringe, D., Petsko, G.A. (1997) Sequence and homology model of 3-isopropylmalate dehydrogenase from the psychrotrophic bacterium *Vibrio* sp. I5 suggest reasons for thermal instability. *Protein Eng* **10**, 665-672
131. Dean, A.M., Dvorak, L. (1995) The role of glutamate 87 in the kinetic mechanism of *Thermus thermophilus* isopropylmalate dehydrogenase. *Protein Sci* **4**, 2156-2167
132. Hurley, J.H., Dean, A.M. (1994) Structure of 3-isopropylmalate dehydrogenase in complex with NAD⁺: ligand-induced loop closing and mechanism for cofactor specificity. *Structure* **2**, 1007-1016
133. Kadono, S., Sakurai, M., Moriyama, H., Sato, M., Hayashi, Y., Oshima, T., Tanaka, N. (1995) Ligand-induced changes in the conformation of 3-isopropylmalate dehydrogenase from *Thermus thermophilus*. *J Biochem* **118**, 745-752
134. Privalov, P.L., Tsalkova, T.N. (1979) Micro- and macro-stabilities of globular proteins. *Nature* **280**, 693-696
135. Bai, Y., Milne, J.S., Mayne, L., Englander, S.W. (1993) Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange. *Proteins* **17**, 75-86
136. Rehder, V., Jaenicke, R. (1992) Stability and reconstitution of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*. *J Biol Chem* **267**, 10999-11006
137. Vihinen, M. (1987) Relationship of protein flexibility to thermostability. *Protein Eng* **1**, 477-480
138. Závodszy, P., Abaturov, L.B., Varshavsky, Y.M. (1966) Structure of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its alteration by coenzyme binding. *Acta Biochim Biophys Acad Sci Hung* **1**, 389-402
139. Sasaki, M., Uno, M., Akanuma, S., Yamagishi, A. (2008) Random mutagenesis improves the low-temperature activity of the tetrameric 3-isopropylmalate dehydrogenase from the hyperthermophile *Sulfolobus tokodaii*. *Protein Eng Des Sel* ,

140. Kílár, F., Závodszy, P. (1987) Non-covalent interactions between Fab and Fc regions in immunoglobulin G molecules. Hydrogen-deuterium exchange studies. *Eur J Biochem* **162**, 57-61
141. Gráczer, E., Varga, A., Hajdú, I., Melnik, B., Szilágyi, A., Semisotnov, G., Závodszy, P., Vas, M. (2007) Rates of unfolding, rather than refolding, determine thermal stabilities of thermophilic, mesophilic, and psychrotrophic 3-isopropylmalate dehydrogenases. *Biochemistry* **46**, 11536-11549
142. Rosso, L., Lobry, J.R., Flandrois, J.P. (1993) An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. *J Theor Biol* **162**, 447-463
143. Cooper, A. (1981) Spurious conformational transitions in proteins? *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 3551-3553
144. Sturtevant, J.M., Mateo, P.L. (1978) Proposed temperature-dependent conformational transition in D-amino acid oxidase: a differential scanning microcalorimetric study. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 2584-2587
145. Stryer, L. (1978) Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler *Annu Rev Biochem* **47**, 819-846
146. Ross, J.B., Schmidt, C.J., Brand, L. (1981) Time-resolved fluorescence of the two tryptophans in horse liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* **20**, 4369-4377
147. Steinberg, I.Z. (1971) Long-range nonradiative transfer of electronic excitation energy in proteins and polypeptides. *Annu Rev Biochem* **40**, 83-114
148. Somogyi, B., Matkó, J., Papp, S., Hevessy, J., Welch, G.R., Damjanovich, S. (1984) Förster-type energy transfer as a probe for changes in local fluctuations of the protein matrix. *Biochemistry* **23**, 3403-3411
149. Watanabe, K., Yamagishi, A. (2006) The effects of multiple ancestral residues on the *Thermus thermophilus* 3-isopropylmalate dehydrogenase. *FEBS Lett* **580**, 3867-3871

Összefoglaló

Az enzimek nagyfokú specificitását egyedi térszerkezetük és felszíni mintázatuk, hatékony funkciójukat szerkezetük rugalmassága, konformációjuk flexibilitása biztosítja. A fehérjemolekulák egyik sajátossága, hogy szerkezeti stabilitásukat és működőképességüket csak megfelelő környezeti tényezők mellett és meglehetősen szűk hőmérsékleti tartományban őrzik meg. A katalitikus funkciók és a konformációs flexibilitás összefüggéseit hidegtűrő, mezofil és hőkedvelő mikroorganizmusokból izolált (ortológ) enzimek sorozatán vizsgáltam, kiszélesítve ezáltal a vizsgálható hőmérséklettartományt. Azokra a kérdésekre kerestem választ, hogy miként valósul meg az enzimek szintjén a környezeti hőmérséklethez való alkalmazkodás, illetve hogyan tükröződik a katalitikus aktivitás megváltozott hőmérsékleti optimuma a fehérjék konformációs stabilitásában és szerkezeti flexibilitásában. A gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) termofil változatának konformációs flexibilitása szobahőmérsékleten alacsonyabb, mint a mezofil változaté, s ezzel együtt katalitikus aktivitása is jóval alacsonyabb. A hőmérsékleti optimumokon viszont a két enzim flexibilitása megegyezik, s aktivitásuk is hasonló. Ez az eredmény egyszerű korrelációt sugall az aktivitás és a flexibilitás között. A hidegtűrő *Vibrio* sp. I5 izopropil-malát dehidrogenáz (IPMDH) enzime esetében azonban a hőmérsékleti alkalmazkodás más stratégiája figyelhető meg: a hideghez való alkalmazkodás a teljes hőmérsékleti tartományban jobb katalitikus aktivitás révén valósul meg, anélkül, hogy ez számottevően nagyobb flexibilitással járna együtt. Az *E. coli* IPMDH katalitikus hatékonyságának (k_{cat}/K_M) hőmérsékletfüggésében szokatlan lokális minimum figyelhető meg, ez az enzim-szubsztrát kölcsönhatás szokatlan hőmérsékletfüggésére vezethető vissza. Szoros összefüggést találtam a relatív doménmozgásokhoz tartozó flexibilitás és a szubsztrát disszociációs állandója között. Ennek alapján valószínűsíthető, hogy a magasabb hőmérsékleten nagyobb amplitúdójú „hinge-bending” fluktuációk megnehezítik a szubsztrát kötődését, ezzel csökkentve az enzim-szubsztrát affinitást. Ez áll tehát a $K_{M,IPM}$ szigmoid jellegű növekedésének hátterében, s így alakulhat ki az IPMDH katalitikus hatékonyságának szokatlan hőmérsékletfüggése. Prolin→glicin mutációk révén megnövelt konformációs flexibilitású *Thermus thermophilus* IPMDH-változatok vizsgálata során azt találtam, hogy azok hőstabilitása kisebb a vad típusúnál, katalitikus aktivitásuk azonban nem növekedett. Mindezek az eredmények azt mutatják, hogy a konformációs flexibilitás és a katalitikus aktivitás között nincs általános, közvetlen, egyszerű összefüggés. A flexibilitás bizonyos fajtáinak szerepe van az enzimműködés bizonyos részfolyamataiban, ilyenkor korreláció is kimutatható. A katalitikus funkció azonban több tényező összjátékának az eredménye, melyek közül csupán az egyik a flexibilitás. Ennek köszönhető a környezeti adaptáció természetben megfigyelt stratégiáinak sokfélesége.

Summary

The high functional specificity of enzymes is a result of their unique structure and surface, while their conformational flexibility and structural plasticity enable them to efficiently exert their catalytic power. One major peculiarity of enzymes is that their structural stability and activity can be upheld only under the appropriate environmental conditions, in a narrow temperature range. I investigated the relationship between catalytic function and conformational flexibility on a series of orthologous enzymes of psychrotrophic, mesophilic and thermophilic origins, thereby broadening the experimental temperature range. I aimed to address questions such as how the adaptation to environmental temperature is accomplished on the level of enzymes, and how the altered temperature optimum of catalytic activity is reflected in the conformational stability and structural flexibility of proteins. At room temperature, the conformational flexibility of the thermophilic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is much less than that of its mesophilic counterpart, and its catalytic activity is also significantly lower. Near their respective physiological temperatures, the conformational flexibilities of the two enzymes are comparable, and their activities are similar. This result suggests a simple correlation between activity and flexibility. The psychrotrophic *Vibrio* sp. 15 isopropylmalate dehydrogenase (IPMDH) exhibits a different adaptation strategy: cold-adaptation is achieved by the creation of an extremely efficient enzyme, which has reduced, but still sufficient activity at low temperature, without an associated higher conformational flexibility. The temperature dependence of the catalytic efficiency of *E. coli* IPMDH shows an unusual local minimum, which is caused by the irregular temperature dependence of the enzyme-substrate interaction. A direct correlation was found between the fluctuations corresponding to relative domain motions and the dissociation constant of the substrate. These findings suggest that the higher-amplitude hinge-bending fluctuations found at higher temperatures increasingly interfere with substrate binding, thereby abruptly increasing its dissociation constant, and leading to the observed unusual temperature dependence of the catalytic efficiency. The thermostabilities of *Thermus thermophilus* IPMDH variants with increased conformational flexibilities (achieved by designed proline→glycine mutations) were found to be lower than that of the wild-type enzyme, while their enzymatic activities were not higher relative to the wild-type. These results show that there is no general, direct, and simple correlation between conformational flexibility and catalytic activity. Certain types of flexibility are essential for certain steps of the catalytic process; thus, correlation is seen. However, catalytic function is the result of an interplay of several factors, of which flexibility is only one; hence the observed diversity of strategies for environmental adaptation in nature.